

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/04281 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/12,  
15/11, C07K 14/435, 16/18, C12P 21/02, C12Q 1/68

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE-  
SELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06104

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Juni 2000 (30.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 31 883.2 9. Juli 1999 (09.07.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg [DE/DE]; Neuenkamper Str. 21, D-42657 Solingen (DE). HARDER, Achim [DE/DE]; Europaring 54, D-51109 Köln (DE). SCHNIEDER, Thomas [DE/DE]; In der Bebie 38, D-30539 Hannover (DE). PAPE, Michaela [DE/DE]; Elkart Allee 21, D-30173 Hannover (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 12. Juli 2001

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: DNA CODING FOR BETA-TUBULIN AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: DNA KODIEREND FÜR BETA-TUBULIN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to DNA which codes for  $\beta$ -tubulin from nematodes of the Strongylidae family, to the polypeptide coded by this DNA, to the use of the DNA for diagnosing anthelmintic resistance in the nematodes concerned and for identifying parasitic nematode species, to the use of the  $\beta$ -tubulin as a component of a vaccine and to a method for identifying novel anthelmintic or antibiotic compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft DNA, die für  $\beta$ -Tubulin aus Nematoden der Familie der Strongylidae kodiert, das von dieser DNA kodierte Polypeptid, die Verwendung der DNA zur Diagnose von anthelmintischer Resistenz bei den betreffenden Nematoden und zur Identifizierung der Spezies parasitärer Nematoden, die Verwendung des  $\beta$ -Tubulins als Bestandteil eines Impfstoffs sowie ein Verfahren zur Identifizierung von neuen anthelmintischen oder antibiotischen Verbindungen.

WO 01/04281 A3



1

2

3

4

5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06104

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/435 C07K16/18 C12P21/02  
C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K C12P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GEARY, T. ET AL.: "Three beta-tubulin cDNAs from the parasitic nematode <i>Haemonchus contortus</i> " MOLECULAR AND BIOMCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 50, 1992, pages 295-306, XP000943402 * 98.2% identity is observed in 448 aa overlap with SEQ ID NO:2 and 82.5% homology in 1380 bp overlap with SEQ ID NO:1 * the whole document --- -/--	1-3, 14-20, 26-31, 35-38, 41-43

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 2000

Date of mailing of the international search report

26.01.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/EP 00/06104

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ELARD, L. ET AL.: "Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of Teledorsagia circumcincta, a nematode parasite of small ruminants" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 79, 1996, pages 249-253, XP000943406 *98.4% identity is observed in 448 aa overlap with SEQ ID NO:2 and 83.1% identity in 1380 bp overlap with SEQ ID NO:1 * the whole document	1-3, 14-20, 26-31, 35-38, 41-43
X	--- WO 92 03549 A (EURO DIAGNOSTICS BV) 5 March 1992 (1992-03-05) cited in the application the whole document -----	1,14-20, 26-31, 35-38, 41-43

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/EP00/06140**

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **32-34, 44-45**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
**1,2a,3a,4,11,13-21,26-31,35-38,41-43 (in partly)**

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 1. Claim nos.: 1, 2a, 3a, 4, 11, 13-21, 35-38, 41-43 (in part)

These claims relate to a DNA which codes for beta-tubulin from the strongylid family, a polynucleotide with at least 85% (95%) identity with a polynucleotide that codes for an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO:2 (*Cyathostomum coronatum*), a DNA sequence corresponding to SEQ ID NO:1, an RNA that complements a DNA of this type, an expression construct (vector) containing a DNA of this type, a host cell containing a DNA/expression construct/vector of this type, a polypeptide coded by a DNA of this type or fragments thereof, a polypeptide corresponding to SEQ ID NO:2, a method for producing a polypeptide of this type, the use of DNA oligonucleotides (DNA) which hybridise with a DNA of this type for detecting DNA originating from cyathostominae, a method for detecting cyathostominae using a DNA of this type, DNA oligonucleotides corresponding to SEQ ID NO:12-51 or sequences derived from the DNA described above, diagnostic test kits comprising oligonucleotides of this type and/or antibodies, antibodies and their use and the use of the aforementioned polypeptides for producing vaccines and a method for identifying substances which modulate the interaction of the beta-tubulin described above.

## 2. Claim nos.: 1, 2b, 3b, 5, 10, 12, 14-20, 22, 26-31, 35-38, 41-43 (in part)

These claims relate to a DNA which codes for beta-tubulin from the strongylid family, a polynucleotide with at least 85% (95%) identity with a polynucleotide that codes for an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO:4 (*Cyclicocyclus nassatus*), a DNA sequence corresponding to SEQ ID NO:3, an RNA that complements a DNA of this type, an expression construct (vector) containing a DNA of this type, a host cell containing a DNA/expression construct/vector of this type, a polypeptide coded by a DNA of this type or fragments thereof, a polypeptide corresponding to SEQ ID NO:4, a method for producing a polypeptide of this type, the use of DNA oligonucleotides (DNA) which hybridise with a DNA of this type for detecting DNA originating from cyathostominae, a method for detecting cyathostominae using a DNA of this type, DNA oligonucleotides corresponding to SEQ ID NO:12-51 or sequences derived from the DNA described above, diagnostic test kits comprising oligonucleotides of this type and/or antibodies, antibodies and their use and the use of the aforementioned polypeptides for producing vaccines and a method for identifying substances which modulate the interaction of the beta-tubulin described above.

## 3. Claim nos.: 1, 2c, 3c, 6, 10, 12, 14-20, 26-31, 35-38, 41-43 (in part)

These claims relate to a DNA which codes for beta-tubulin from the strongylid family, a polynucleotide with at least 85% (95%) identity with a polynucleotide that codes for an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO:6 (*Cyclicocyclus nassatus*), a DNA sequence corresponding to SEQ ID NO:5, an RNA that complements a DNA of this type, an expression construct (vector) containing a DNA of this type, a host cell containing a DNA/expression construct/vector of this type, a polypeptide coded by a DNA of this type or fragments thereof, a polypeptide corresponding to SEQ ID NO:5 a method for producing a polypeptide of this type, the use of DNA oligonucleotides (DNA) which hybridise with a DNA of this type for detecting DNA originating from cyathostominae, a method for detecting cyathostominae using a DNA of this type, DNA oligonucleotides corresponding to SEQ ID NO:12-51 or sequences derived from the DNA described above, diagnostic test kits comprising oligonucleotides of this type and/or antibodies, antibodies and their use and the use of the aforementioned polypeptides for producing vaccines and a method for identifying substances which modulate the interaction of the beta-tubulin described above.

## 4. Claim nos.: 1, 2d, 3d, 7, 10, 12, 14-20, 24, 35-38, 41-43 (in part)

These claims relate to a DNA which codes for beta-tubulin from the strongylid family, a polynucleotide with at least 85% (95%) identity with a polynucleotide that codes for an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO:8 (*Cyclicocyclus nassatus*), a DNA sequence

corresponding to SEQ ID NO:7, an RNA that complements a DNA of this type, an expression construct (vector) containing a DNA of this type, a host cell containing a DNA/expression construct/vector of this type, a polypeptide coded by a DNA of this type or fragments thereof, a polypeptide corresponding to SEQ ID NO:8, a method for producing a polypeptide of this type, the use of DNA oligonucleotides (DNA) which hybridise with a DNA of this type for detecting DNA originating from cyathostominae, a method for detecting cyathostominae using a DNA of this type, DNA oligonucleotides corresponding to SEQ ID NO:12-51 or sequences derived from the DNA described above, diagnostic test kits comprising oligonucleotides of this type and/or antibodies, antibodies and their use and the use of the aforementioned polypeptides for producing vaccines and a method for identifying substances which modulate the interaction of the beta-tubulin described above.

5. Claim nos.: 1, 2e, 3e, 8, 10, 12, 14-20, 25, 26-31, 41-43 (in part)

These claims relate to a DNA which codes for beta-tubulin from the strongylid family, a polynucleotide with at least 85% (95%) identity with a polynucleotide that codes for an amino acid sequence corresponding to SEQ ID NO:10 (*Cyclicocyclus nassatus*), a DNA sequence corresponding to SEQ ID NO:9, an RNA that complements a DNA of this type, an expression construct (vector) containing a DNA of this type, a host cell containing a DNA/expression construct/vector of this type, a polypeptide coded by a DNA of this type or fragments thereof, a polypeptide corresponding to SEQ ID NO:9, a method for producing a polypeptide of this type, the use of DNA oligonucleotides (DNA) which hybridise with a DNA of this type for detecting DNA originating from cyathostominae, a method for detecting cyathostominae using a DNA of this type, DNA oligonucleotides corresponding to SEQ ID NO:12-51 or sequences derived from the DNA described above, diagnostic test kits comprising oligonucleotides of this type and/or antibodies, antibodies and their use and the use of the aforementioned polypeptides for producing vaccines and a method for identifying substances which modulate the interaction of the beta-tubulin described above.

6. Claim nos.: 9, 10, 12, 14-20, 26-31, 35-38, 41-43 (in part)

These claims relate to a DNA corresponding to SEQ ID NO:11, an RNA that complements a DNA of this type, an expression construct (vector) containing a DNA of this type, a host cell containing a DNA/expression construct/vector of this type, a polypeptide coded by a DNA of this type or fragments thereof, a method for producing a polypeptide of this type, the use of DNA oligonucleotides (DNA) which hybridise with a DNA of this type for detecting DNA originating from cyathostominae, a method for detecting cyathostominae using a DNA of this type, DNA oligonucleotides corresponding to SEQ ID NO:12-51 or sequences derived from the DNA described above, diagnostic test kits comprising oligonucleotides of this type and/or antibodies, antibodies and their use and the use of the aforementioned polypeptides for producing vaccines and a method for identifying substances which modulate the interaction of the beta-tubulin described above.

7. Claim nos.: 39-40

These claims relate very generally to a method for identifying substances which modulate the interaction of any tubulin, to substances identified using this method and to the use of such substances for treating nematosis.

Continued from field I.2

Claim nos.: 32-34, 44-45

Patent claim nos. 32-34 relate to a disproportionately large number of claimed DNA oligonucleotides (39) and/or to a disproportionately large number of oligonucleotides from the DNA sequences corresponding to claim nos. 1-15 and to diagnostic test kits containing these oligonucleotides and/or antibodies. Due to the excessively large number of possible oligonucleotides which fall under the claim for protection, a meaningful search was impossible.

The same applies to patent claim nos. 44-45, which relate to all possible substances and their use, these substances being identified in a method corresponding to claim nos. 39-43. This statement of claim also renders a meaningful search impossible, due to the excessive number of possible claimed substances.

The applicant is advised that patent claims relating to inventions for which no international search has been produced cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). As a general rule, the EPO in its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out an international preliminary examination will not conduct a preliminary examination for subjects in respect of which no search has been provided. This also applies to cases where the patent claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or to cases where the applicant presents new patent claims in the course of the PCT Chapter II procedure.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06104

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9203549 A	05-03-1992	NL 9001832 A	16-03-1992
		AT 192491 T	15-05-2000
		AU 8413691 A	17-03-1992
		DE 69132173 D	08-06-2000
		EP 0668908 A	30-08-1995
		NZ 239411 A	25-02-1994
		ZA 9106512 A	27-05-1992
-----			



f

.

9

6

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/435 C07K16/18 C12P21/02  
C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K C12P C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>GEARY, T. ET AL.: "Three beta-tubulin cDNAs from the parasitic nematode <i>Haemonchus contortus</i>"</p> <p>MOLECULAR AND BIOMCHEMICAL PARASITOLOGY, Bd. 50, 1992, Seiten 295-306, XP000943402</p> <p>* 98.2% identity is observed in 448 aa overlap with SEQ ID NO:2 and 82.5% homology in 1380 bp overlap with SEQ ID NO:1 *</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1-3, 14-20, 26-31, 35-38, 41-43</p>

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Dezember 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26.01.01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>ELARD, L. ET AL.: "Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of Teledorsagia circumcincta, a nematode parasite of small ruminants" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, Bd. 79, 1996, Seiten 249-253, XP000943406</p> <p>*98.4% identity is observed in 448 aa overlap with SEQ ID NO:2 and 83.1% identity in 1380 bp overlap with SEQ ID NO:1 *</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-3, 14-20, 26-31, 35-38, 41-43</p>
X	<p>WO 92 03549 A (EURO DIAGNOSTICS BV) 5. März 1992 (1992-03-05) in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1,14-20, 26-31, 35-38, 41-43</p>

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. **32-34, 44-45**   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich   
 **siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:   
 **1, 2a, 3a, 4, 11, 13-21, 26-31, 35-38, 41-43 (teilweise)**

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 1. Ansprüche: 1,2a,3a,4,11,13-21,26-31,35-38,41-43 (teilweise)

Der Gegenstand dieser Ansprüche ist auf eine DNA kodierend für beta-Tubulin aus der Familie Strongylidia, ein Polynukleotid mit mindestens 85% (95%) Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NO:2 (Cyathostomum coronatum), eine DNA-Sequenz gemäss SEQ ID NO: 1, eine RNA komplementär zu solch einer DNA, ein Expressionskonstrukt (Vektor) enthaltend solch eine DNA, eine Wirtszelle enthaltend solch eine DNA/Expressionskonstrukt/Vektor, ein Polypeptid kodiert von solch einer DNA oder Fragmente davon, ein Polypeptid gemäss SEQ ID NO:2, ein Verfahren zur Herstellung solch eines Polypeptids, die Verwendung von DNA-Oligonukleotiden (DNA) die an solch eine DNA hybridisieren zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt, ein Verfahren zur Detektion von Cyathostominae mittels solch einer DNA, DNA-Oligonukleotide gemäss SEQ ID NO:12-51 oder aus oben beschriebener DNA abgeleitete Sequenzen und diagnostische Testkits umfassend solche Oligonukleotide und/oder Antikörper, Antikörper und deren Verwendung sowie die Verwendung von oben genannten Polypeptiden zur Herstellung von Vakzinen und ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Interaktion von obigem beta-Tubulin modulieren gerichtet.

## 2. Ansprüche: 1,2b,3b,5,10,12, 14-20,22, 26-31,35-38, 41-43 (teilweise)

Der Gegenstand dieser Ansprüche ist auf eine DNA kodierend für beta-Tubulin aus der Familie Strongylidia, ein Polynukleotid mit mindestens 85% (95%) Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NO:4 (Cyclicocyclus nassatus), eine DNA-Sequenz gemäss SEQ ID NO: 3, eine RNA komplementär zu solch einer DNA, ein Expressionskonstrukt (Vektor) enthaltend solch eine DNA, eine Wirtszelle enthaltend solch eine DNA/Expressionskonstrukt/Vektor, ein Polypeptid kodiert von solch einer DNA oder Fragmente davon, ein Polypeptid gemäss SEQ ID NO:4, ein Verfahren zur Herstellung solch eines Polypeptids, die Verwendung von DNA-Oligonukleotiden (DNA) die an solch eine DNA hybridisieren zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt, ein Verfahren zur Detektion von Cyathostominae mittels solch einer DNA, DNA-Oligonukleotide gemäss SEQ ID NO:12-51 oder aus oben beschriebener DNA abgeleitete Sequenzen und diagnostische Testkits umfassend solche Oligonukleotide und/oder Antikörper, Antikörper und deren Verwendung sowie die Verwendung von oben genannten Polypeptiden zur Herstellung von Vakzinen und ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Interaktion von obigem beta-Tubulin modulieren gerichtet.

## 3. Ansprüche: 1,2c,3c,6,10,12, 14-20,23, 26-31,35-38,

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

41-43 (teilweise)

Der Gegenstand dieser Ansprüche ist auf eine DNA kodierend für beta-Tubulin aus der Familie Strongylidia, ein Polynukleotid mit mindestens 85% (95%) Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NO:6 (Cyclicocyclus nassatus), eine DNA-Sequenz gemäss SEQ ID NO: 5, eine RNA komplementär zu solch einer DNA, ein Expressionskonstrukt (Vektor) enthaltend solch eine DNA, eine Wirtszelle enthaltend solch eine DNA/Expressionskonstrukt/Vektor, ein Polypeptid kodiert von solch einer DNA oder Fragmente davon, ein Polypeptid gemäss SEQ ID NO:5, ein Verfahren zur Herstellung solch eines Polypeptids, die Verwendung von DNA-Oligonukleotiden (DNA) die an solch eine DNA hybridisieren zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt, ein Verfahren zur Detektion von Cyathostominae mittels solch einer DNA, DNA-Oligonukleotide gemäss SEQ ID NO:12-51 oder aus oben beschriebener DNA abgeleitete Sequenzen und diagnostische Testkits umfassend solche Oligonukleotide und/oder Antikörper, Antikörper und deren Verwendung sowie die Verwendung von oben genannten Polypeptiden zur Herstellung von Vakzinen und ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Interaktion von obigem beta-Tubulin modulieren gerichtet.

4. Ansprüche: 1,2d,3d,7,10,12, 14-20,24, 26-31,35-38,  
41-43 (teilweise)

Der Gegenstand dieser Ansprüche ist auf eine DNA kodierend für beta-Tubulin aus der Familie Strongylidia, ein Polynukleotid mit mindestens 85% (95%) Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NO:8 (Cyclicocyclus nassatus), eine DNA-Sequenz gemäss SEQ ID NO: 7, eine RNA komplementär zu solch einer DNA, ein Expressionskonstrukt (Vektor) enthaltend solch eine DNA, eine Wirtszelle enthaltend solch eine DNA/Expressionskonstrukt/Vektor, ein Polypeptid kodiert von solch einer DNA oder Fragmente davon, ein Polypeptid gemäss SEQ ID NO:8, ein Verfahren zur Herstellung solch eines Polypeptids, die Verwendung von DNA-Oligonukleotiden (DNA) die an solch eine DNA hybridisieren zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt, ein Verfahren zur Detektion von Cyathostominae mittels solch einer DNA, DNA-Oligonukleotide gemäss SEQ ID NO:12-51 oder aus oben beschriebener DNA abgeleitete Sequenzen und diagnostische Testkits umfassend solche Oligonukleotide und/oder Antikörper, Antikörper und deren Verwendung sowie die Verwendung von oben genannten Polypeptiden zur Herstellung von Vakzinen und ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Interaktion von obigem beta-Tubulin modulieren gerichtet.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 5. Ansprüche: 1,2e,3e,8,10,12, 14-20,25, 26-31,35-38, 41-43 (teilweise)

Der Gegenstand dieser Ansprüche ist auf eine DNA kodierend für beta-Tubulin aus der Familie Strongylidia, ein Polynukleotid mit mindestens 85% (95%) Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NO:10 (Cyclicocyclus nassatus), eine DNA-Sequenz gemäss SEQ ID NO: 9, eine RNA komplementär zu solch einer DNA, ein Expressionskonstrukt (Vektor) enthaltend solch eine DNA, eine Wirtszelle enthaltend solch eine DNA/Expressionskonstrukt/Vektor, ein Polypeptid kodiert von solch einer DNA oder Fragmente davon, ein Polypeptid gemäss SEQ ID NO:10, ein Verfahren zur Herstellung solch eines Polypeptids, die Verwendung von DNA-Oligonukleotiden (DNA) die an solch eine DNA hybridisieren zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt, ein Verfahren zur Detektion von Cyathostominae mittels solch einer DNA, DNA-Oligonukleotide gemäss SEQ ID NO:12-51 oder aus oben beschriebener DNA abgeleitete Sequenzen und diagnostische Testkits umfassend solche Oligonukleotide und/oder Antikörper, Antikörper und deren Verwendung sowie die Verwendung von oben genannten Polypeptiden zur Herstellung von Vakzinen und ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Interaktion von obigem beta-Tubulin modulieren gerichtet.

## 6. Ansprüche: 9,10,12,14-20,26-31,35-38,41-43 (teilweise)

Der Gegenstand dieser Ansprüche ist auf eine DNA gemäss SEQ ID NO:11 (Cyclicocyclus nassatus), eine RNA komplementär zu solch einer DNA, ein Expressionskonstrukt (Vektor) enthaltend solch eine DNA, eine Wirtszelle enthaltend solch eine DNA/Expressionskonstrukt/Vektor, ein Polypeptid kodiert von solch einer DNA oder Fragmente davon, ein Verfahren zur Herstellung solch eines Polypeptids, die Verwendung von DNA-Oligonukleotiden (DNA) die an solch eine DNA hybridisieren zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt, ein Verfahren zur Detektion von Cyathostominae mittels solch einer DNA, DNA-Oligonukleotide gemäss SEQ ID NO:12-51 oder aus oben beschriebener DNA abgeleitete Sequenzen und diagnostische Testkits umfassend solche Oligonukleotide und/oder Antikörper, Antikörper und deren Verwendung sowie die Verwendung von oben genannten Polypeptiden zur Herstellung von Vakzinen und ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Interaktion von obigem beta-Tubulin modulieren gerichtet.

## 7. Ansprüche: 39-40

Diese Ansprüche sind ganz allgemein auf ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die die Interaktion von jeglichem Tubulin modulieren, Substanzen, die durch dieses



WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Verfahren identifiziert werden und die Verwendung von solchen Substanzen zur Behandlung von Nematodenbefall gerichtet.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld 1.2

Ansprüche Nr.: 32-34,44-45

Die geltenden Patentansprüche 32-34 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl an beanspruchten DNA-Oligonukleotiden (39) und/oder auf eine unbegrenzte Zahl von DNA-Oligonukleotiden aus den DNA Sequenzen gemäss Anspruch 1-15, sowie auf diagnostische Testkits die diese Oligonukleotide und/oder Antikörper enthalten. Aufgrund der übermässig grossen Zahl von möglichen Oligonukleotiden, die unter den Schutzanspruch dieser Ansprüche fallen, war eine sinnvolle Recherche nicht möglich.

Dies gilt auch für die Patentansprüche 44-45, die auf alle möglichen Substanzen und deren Verwendung gerichtet sind, die in einem Verfahren gemäss den Ansprüchen 39-43 identifiziert werden. Auch dieses Anspruchsbegehren ermöglicht aufgrund der übergrossen Zahl von möglichen beanspruchten Substanzen keine sinnvolle und aussagekräftige Recherche.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06104

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9203549 A	05-03-1992	NL 9001832 A	16-03-1992
		AT 192491 T	15-05-2000
		AU 8413691 A	17-03-1992
		DE 69132173 D	08-06-2000
		EP 0668908 A	30-08-1995
		NZ 239411 A	25-02-1994
		ZA 9106512 A	27-05-1992
-----			



1

2

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

not. JS

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/04281 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/00

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06104

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Juni 2000 (30.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 31 883.2 9. Juli 1999 (09.07.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg [DE/DE]; Neuenkamper Str. 21, D-42657 Solingen (DE). HARDER, Achim [DE/DE]; Europaring 54, D-51109 Köln (DE). SCHNIEDER, Thomas [DE/DE]; In der Bebie 38, D-30539 Hannover (DE). PAPE, Michaela [DE/DE]; Elkart Allee 21, D-30173 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Le A 33 759

(54) Title: DNA CODING FOR  $\beta$ -TUBULIN AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: DNA KODIEREND FÜR  $\beta$ -TUBULIN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to DNA which codes for  $\beta$ -tubulin from nematodes of the Strongylidae family, to the polypeptide coded by this DNA, to the use of the DNA for diagnosing anthelmintic resistance in the nematodes concerned and for identifying parasitic nematode species, to the use of the  $\beta$ -tubulin as a component of a vaccine and to a method for identifying novel anthelmintic or antibiotic compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft DNA, die für  $\beta$ -Tubulin aus Nematoden der Familie der Strongylidae kodiert, das von dieser DNA kodierte Polypeptid, die Verwendung der DNA zur Diagnose von anthelmintischer Resistenz bei den betreffenden Nematoden und zur Identifizierung der Spezies parasitärer Nematoden, die Verwendung des  $\beta$ -Tubulins als Bestandteil eines Impfstoffs sowie ein Verfahren zur Identifizierung von neuen anthelmintischen oder antibiotischen Verbindungen.

WO 01/04281 A2

1. The first part of the document is a letter from the President of the United States to the President of the Senate, dated January 1, 1901. The letter is signed by William McKinley and is addressed to Charles McNary. The letter is a copy of a letter that was sent to the President of the Senate by the President of the United States.

**DNA kodierend für  $\beta$ -Tubulin und deren Verwendung**

Die Erfindung betrifft DNA, die für  $\beta$ -Tubulin aus Nematoden der Familie der Strongylidae kodiert, das von dieser DNA kodierte Polypeptid, die Verwendung der DNA zur Diagnose von anthelmintischer Resistenz dieser Nematoden und zur Identifizierung der Spezies dieser Nematoden, die Verwendung des  $\beta$ -Tubulins als Bestandteil eines Impfstoffs sowie ein Verfahren zur Identifizierung von neuen anthelmintischen oder antibiotischen Verbindungen.

Parasitische Helminthen (Würmer) stellen für Menschen und Tiere ein Gesundheitsproblem dar und verursachen bedeutende wirtschaftliche Schäden. Die Ausgaben für Anthelmintika betrugen im Jahr 1996 weltweit mehr als 2 Milliarden US-Dollar. Die wichtigsten Anthelmintika, die derzeit Anwendung finden, können nach ihrem Wirkmechanismus in drei Gruppen aufgeteilt werden:

1. Die zyklischen Amidine Pyrantel und Morantel wirken zusammen mit den Imidazothiazolen Tetramisol und Levamisol als cholinerge Verbindungen für das parasitäre Nervensystem.

2. Die Benzimidazole sind Inhibitoren der Polymerisation von Mikrotubuli und führen zur Degradation von Tubulin, gefolgt vom Verlust mehrerer Zellfunktionen wie dem Transport innerhalb von Zellen und der Zellteilung.

3. Die makrozyklischen Lactone binden und öffnen glutaminergische Chlorid-Kanäle und wirken so als Inhibitoren des Nervensystems von Nematoden und Arthropoden.

Mikrotubuli sind aus Tubulin-Untereinheiten aufgebaut. Tubulin ist ein dimeres Protein, das aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin besteht und in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Tubulin und Mikrotubuli vorliegt. Dieses Gleichgewicht kann durch

exogene Substanzen beeinflusst werden, die man als Mikrotubuli-Inhibitoren bezeichnet. Einige dieser Inhibitoren, wie z.B. die Benzimidazole, wirken durch ihre Bindung an Tubulin, wodurch sie die Selbstassoziation dieser Untereinheiten an wachsende Mikrotubuli verhindern, während am entgegengesetzten Ende die Dissoziation der Mikrotubuli fortgesetzt wird. Dadurch kommt es zu Fehlfunktionen bei lebenswichtigen Prozessen innerhalb der Zelle und schließlich zum Absterben der Zelle und des gesamten Organismus (Lacey, E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* 6, 112-115). Zu solchen Mikrotubuli-Inhibitoren gehören verschiedene Verbindungsklassen, die synthetisch hergestellt oder von verschiedenen Organismen produziert werden.

Die Bindung von Mikrotubuli-Inhibitoren an Tubulin aus verschiedenen Organismen zeigt große Unterschiede hinsichtlich der Affinität der Bindung. So zeigen die Anthelmintika Oxfendazol und Thiabendazol eine hohe Affinität an Tubulin aus *Ascaridia galli* und eine nur geringe Affinität zu Tubulin aus Säugetieren wie dem Schaf (Dawson et al. (1983) Purification and characterisation of tubulin from the parasitic nematode, *Ascaridia galli*, *Molecular and Biochemical Parasitology* 7, 267-277). Die selektive Toxizität von Benzimidazolen kann anhand dieser selektiven Affinität erklärt werden (Lacey, E. (1988) The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles, *International Journal for Parasitology* 18, 885-936).

Der verbreitete Gebrauch dieser Anthelmintika hat zu erheblichen Resistenzproblemen gegen alle drei Klassen vor allem in Nutztier geführt (Bauer et al. (1994) Anthelmintic resistance in nematodes of farm animals. A seminar organised for the European Commission, Brüssel, Belgien, 8. bis 9. November 1993, S. 17-24). Die verbreitetste Klasse der Anthelmintika sind die Benzimidazole. Resistenz gegen Benzimidazole wurde weltweit bei Parasiten von Schafen, Rindern, Schweinen und Pferden beschrieben. Benzimidazole sind Breitspektrum-Anthelmintika mit Wirkung gegen Nematoden, Cestoden und Trematoden. Untersuchungen in deutschen Pferdegestüten ergab eine Resistenz von kleinen Strongyloiden gegen Benzimidazole in



mehr als 80 % der Fälle (Ulrich et al. (1988) Benzimidazole resistance in small strongylids (Cyathostominae): distribution in horse stock in Northrhine-Westphalia, Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift 101, 406-408).

5 Für eine effektive Behandlung mit Anthelmintika ist es deshalb von großer Bedeutung, Informationen über mögliche Resistenzen von Würmern eines Pferdes oder innerhalb einer Pferdeherde zu erhalten. Um die mögliche Resistenz einer Wurmpopulation kleiner Strongyliden zu überprüfen, wurden bereits diagnostische  
10 Verfahren entwickelt, die auf der Wirksamkeit von Anthelmintika in den Entwicklungsstadien der Parasiten (Eier, Larven) beruhen (Coles et al. (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance, Veterinary Parasitology, 44, 35-44). Der "Larval development assay" (LDA) beschreibt den inhibitorischen Effekt von Anthelmintika im nicht-parasitären ersten  
15 Larvenstadium in Abhängigkeit von der eingesetzten Anthelmintika-Konzentration. In ähnlicher Weise nutzt der zweite Ansatz, der "egg hatch assay" (EHA) die inhibitorische Wirkung der Anthelmintika auf das Schlüpfen der Larven in Abhängigkeit von der eingesetzten Anthelmintika-Konzentration. Ein Nachteil beider Ansätze liegt in der geringen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Zudem sind beide Ansätze zeit-  
20 aufwendig und arbeitsintensiv.

Die Sensitivität beider Ansätze ist zudem gering. Eine bestehende Resistenz wird nur dann detektiert, wenn mehr als 25 % der Population resistent sind (Roos et al. (1995) New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in  
25 parasitic nematodes, Parasitology Today 11, 148-150).

Es besteht deshalb ein dringender Bedarf an diagnostischen Verfahren, die empfindlich, schnell und reproduzierbar sind. Für die Parasiten des Schafes, *Haemonchus contortus* und *Teladorsagia circumcincta* wurde ein auf der PCR-Technik beruhendes  
30 Verfahren beschrieben. Dieses beruht auf mindestens einer Punktmutation in Kodon 200 des  $\beta$ -Tubulin-Isotyp 1-Gens (Elard et al. (1999) PCR diagnosis of benz-

imidazole - susceptibility or - resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*, Veterinary Parasitology 80, 231-237). Die Punktmutationen in Kodon 200 resultieren in einem Aminosäureaustausch von Phenylalanin zu Tyrosin und korreliert mit einer Benzimidazol-Resistenz des mutierten Proteins (Kwa et al. (1995)  $\beta$ -tubulin genes from parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*, Journal of Molecular Biology 246, 500-510).

Aus Studien an *Haemonchus contortus* ist bekannt, daß die für Tubulin kodierenden Sequenzen von Nematoden spezies-spezifisch sind (WO 92/03549).

Die verschiedenen Spezies der kleinen Strongyliden des Pferdes unterscheiden sich in ihrer epidemiologischen Häufigkeit. Zu den weltweit wichtigsten und am häufigsten gefundenen Spezies gehören *Cylicocyclus nassatus*, *Cyathostomum coronatum* und *Cyathostomum catinatum*. Resistenzen dieser Spezies gegen Benzimidazole wurden in verschiedenen Ländern beschrieben, u.a. auch in Deutschland (Burger, H.-J. und Bauer, C. (1987) Efficacy of four anthelmintics against benzimidazole - resistant cyathostomes of horses, Veterinary Record 120, 293-296).

20

Die Nukleinsäure-Sequenzierung von  $\beta$ -Tubulin-cDNAs aus den erfindungsgemäßen Spezies kleiner Strongyliden wiesen eine Identität von über 95 % auf. Die Identität mit den bekannten, oben genannten  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen von Schaf-Parasiten beträgt dagegen nur 75,4-82,6 %.

25

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind innerhalb der erfindungsgemäßen Sequenzen sehr ähnlich. Das gilt auch für die abgeleiteten  $\beta$ -Tubulin-Aminosäuresequenzen der Schaf-Parasiten. Die Identität liegt dabei zwischen 95 und 99,8 %. Es ergeben sich nur sehr wenige Positionen, an denen ein Aminosäureaustausch auftritt. Hervorzuheben ist hier das Kodon 200, in dem ein Wechsel von Phenylalanin zu Tyrosin resultiert.

30

Allerdings zeigen die bisher veröffentlichten nichtkodierenden  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen aus verschiedenen Helminthen-Spezies keine signifikante Identität. Es ist demnach  
5 überraschend, daß nicht nur die kodierenden Sequenzen, sondern auch Teile der nichtkodierenden Sequenzen der verschiedenen Spezies kleiner Strongyliden der hier vorliegenden Anmeldung eine hohe Identität aufweisen. Diese Regionen sind deshalb auch geeignet, um verschiedene Spezies kleiner Strongyliden und andere Nematoden-Spezies voneinander unterscheiden zu können. PCR-Primer, die aus diesen  
10 Intron-Regionen abgeleitet sind, können der spezifischen Detektion kleiner Strongyliden innerhalb einer Probe dienen, die auch genetisches Material aus anderen helmintischen Organismen enthält.

$\beta$ -Tubulin aus Nematoden oder Teile davon sind dafür bekannt, ein protektives,  
15 immunologisches Potential zu besitzen (Bughio et al. (1993) Characterisation and biological activities of anti-*Brugia pahangi* tubulin monoclonal antibodies, International Journal for Parasitology, 7, 913-924). Das von der oben genannten DNA kodierte  $\beta$ -Tubulin der kleinen Strongyliden kann als Vakzine ebenso verwendet werden wie monoklonale Antikörper gegen das  $\beta$ -Tubulin.

20 Inhibitoren der Interaktion des Tubulins bzw. seiner Untereinheiten, wie Benzimidazole, Colchizine und Taxol sind wichtige Leitstrukturen einer Reihe von Therapeutika, die gegen menschliche, tierische oder pflanzliche Krankheiten gerichtet sind. Die Bedeutung des Tubulins als Ziel dieser Verbindungen ist weitreichend und unterstreicht dessen Potential für die Suche nach neuen Wirkstoffen zur Bekämpfung  
25 dieser Krankheiten.

Gegenstand der Erfindung ist die für das  $\beta$ -Tubulin aus Nematoden der Familie der Strongylidae, besonders der Subfamilie der Cyathostominae kodierende DNA oder  
30 Fragmente dieser DNA. Die  $\beta$ -Tubulin-DNA kann dabei genomische DNA oder cDNA sein. Die DNA-Sequenzen, die Gegenstand dieser Erfindung sind, können als

neue Mitglieder der Tubulin-Genfamilie parasitischer Nematoden der Ordnung Strongylida, besonders der Subfamilie der Cyathostominae betrachtet werden. Die Erfindung bezieht sich ganz besonders auf die DNA-Sequenzen, die für  $\beta$ -Tubulin aus parasitischen Nematoden der Gattungen *Cyathostomum* und *Cylicocyclus* kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls DNA-Sequenzen, die zu einem für eine der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 oder 10 kodierenden Polynukleotid eine Identität von mehr als 85 % aufweisen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls bevorzugt DNA-Sequenzen, die zu einem für eine der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 oder 10 kodierenden Polynukleotid eine Identität von mehr als 95 % aufweisen.

Gegenstand der Erfindung sind im besonderen für  $\beta$ -Tubulin kodierende DNA-Sequenzen, die aus parasitischen Nematoden der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum* stammen, ganz besonders solche Sequenzen, die aus parasitischen Nematoden der Art *Cylicocyclus nassatus* stammen, bevorzugt DNA gemäß SEQ ID NO. 3, 5, 7, 9 oder 11 oder aus *Cyathostomum coronatum*, bevorzugt DNA gemäß SEQ ID NO. 1.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls DNA-Sequenzen wie oben beschrieben, die im Unterschied zu diesen Sequenzen in Kodon 200 mindestens eine Punktmutation bzw. einen Nukleotidaustausch aufweisen. Diese Punktmutationen resultieren in einer Änderung der von dieser DNA kodierten Aminosäuresequenz, z. B. einem Austausch der Aminosäure Phenylalanin gegen Tyrosin und korrelieren mit der Resistenz von Tubulin mit entsprechenden Mutationen gegen Benzimidazole.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls DNA-Sequenzen, die komplementär zur oben beschriebenen DNA oder Fragmenten dieser DNA sind, sowie Fragmente, dieser DNA-Sequenzen. Diese DNA-Sequenzen bzw. diese Fragmente umfassen

Oligonukleotide, die von einer der oben genannten oder unter SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 beschriebenen DNA-Sequenzen abgeleitet sind oder von dazu zu 85% identischen, bevorzugt zu 95% identischen Sequenzen sowie von dazu komplementären Strängen abgeleitet sind und an diese hybridisieren können.

5

Gegenstand der Erfindung sind dabei bevorzugt Oligonukleotide bestehend aus oder umfassend eine der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 12 bis SEQ ID NO. 51, die an oben genannte DNA-Sequenzen hybridisieren, bevorzugt im Bereich nicht kodierender Sequenzabschnitte der  $\beta$ -Tubulin-Gene.

10

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls bevorzugt Oligonukleotide bestehend aus oder umfassend eine der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 12 bis SEQ ID NO. 51, die an kodierende Bereiche der oben genannten Sequenzen hybridisieren.

15

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls RNA-Sequenzen, die komplementär zur oben beschriebenen DNA oder Fragmenten dieser DNA sind, sowie Fragmente dieser RNA-Sequenzen. Diese RNA-Sequenzen bzw. diese Fragmente umfassen Ribooligonukleotide, die einer Region einer der oben genannten oder unter SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 beschriebenen DNA-Sequenzen, dazu komplementärer Sequenzen oder dazu zu 85 %, bevorzugt zu 95% identischer DNA-Sequenzen entsprechen und an diese hybridisieren können.

20

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Expressionskonstrukt, welches eine der oben beschriebenen DNA-Sequenzen umfaßt, sowie eine damit verknüpfte DNA-Sequenz, die die Expression der DNA ermöglicht. Dazu gehören beispielsweise mindestens ein Promotor zur konstitutiven oder induzierbaren Expression oder auch Enhancer. Passende Promotoren für eine Expression in *E. coli* sind natürliche Hybrid- oder Bakteriophagen-Promotoren, bevorzugt Promotoren der Gruppe der  $\lambda$ -Phagen, hsp, omp oder synthetische Promotoren wie z.B. in WO 98/5625, DE 3 430 683 oder EP 0 173 149 genannt.

30

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Vektoren, die eine der oben beschriebenen DNA-Sequenzen umfassen und die Expression des erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulins oder Fragmenten davon in einer Wirtszelle ermöglichen.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Wirtszellen, die die oben genannte DNA enthalten, ein Expressionskonstrukt wie obengenannt, oder einen Vektor und die Expression des  $\beta$ -Tubulins oder Fragmente davon gestatten.

- 10 Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Polypeptide, die von einer der oben genannten DNA-Sequenzen oder Fragmenten dieser DNA-Sequenzen kodiert werden, sowie Fragmente dieser Polypeptide.

- 15 Gegenstand der Erfindung sind dabei bevorzugt Polypeptide, die von einer DNA-Sequenz umfassend SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 kodiert werden, von DNA-Sequenzen, die zu diesen Sequenzen eine Identität von 85 %, bevorzugt von 95 % aufweisen, oder von Fragmenten dieser DNA.

- 20 Gegenstand dieser Erfindung sind auch Polypeptide, die von einer oben beschriebenen DNA-Sequenz kodiert werden, die mindestens eine Punktmutation in Kodon 200 wie oben beschrieben enthalten und Resistenz gegenüber Benzimidazolen zeigen, sowie Fragmente dieser Polypeptide.

- 25 Gegenstand der Erfindung sind dabei ganz besonders bevorzugt Polypeptide umfassend eine der in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 oder 10 beschriebenen Aminosäuresequenzen oder Fragmente davon.

Die Erfindung bezieht sich dabei auf Polypeptide, besonders auf aufgereinigte Polypeptide oder rekombinant hergestellte Polypeptide.

- 30 Die Erfindung bezieht sich auf Polypeptide voller Länge und auch auf entsprechende Fragmente dieser Polypeptide, z.B. bestimmte Motive oder Domänen. Diese Frag-

mente können von unterschiedlicher Länge sein und z.B. 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 oder 300 Aminosäuren umfassen.

5 Diese Erfindung bezieht sich ebenfalls auf Fusionsproteine, die ein Polypeptid wie oben beschrieben umfassen. Das Fusionsprotein kann dabei einen weiteren Polypeptidanteil enthalten, das nicht in Zusammenhang mit dem  $\beta$ -Tubulin steht (z.B. LexA, B42, Glutathione-S-Transferase, einen His-Tag, ein Polypeptid mit enzymatischer Aktivität wie die alkalische Phosphatase oder einen Epitop-Tag).

10 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids wie oben beschrieben in passenden prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionssystemen. Die Expression kann dabei permanent oder transient in einer jeweils entsprechenden Zelllinie bzw. entsprechenden Wirtszellen wie oben beschrieben erfolgen. Passende prokaryontische Expressionssysteme sind bekannte Wirts-Vektor-  
15 Systeme wie Bakterien (z.B. *Streptomyces* spp., *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* und besonders *Escherichia coli*).

Die Expression in einem eukaryontischen System erfolgt bevorzugt im Baculovirus-System, besonders in einem System, das das Einführen posttranslationaler Modifikationen gestattet.  
20

Gegenstand dieser Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von DNA wie obengenannt zur Detektion von DNA aus Nematoden der Familie Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cyathostomum* und *Cylicocyclus*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cyathostomum coronatum* und *Cylicocyclus nassatus*. Die Erfindung bezieht sich dabei auf Oligonukleotide wie obengenannt, die komplementär zu für  $\beta$ -Tubulin kodierender DNA oder dazu komplementären Stränge sind und an diese DNA hybridisieren können. Bevorzugt hybridisieren diese Oligonukleotide an die Intron-Regionen, d.h. die nicht  
25 kodierenden DNA-Sequenzen. Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung dieser Oligonukleotide oder Teilen davon als  
30

- a) Proben in Northern- oder Southern-Blot-Assays,
- b) PCR-Primer in einem diagnostischen Verfahren zur Detektion der oben genannten Nematoden, wobei die DNA der betreffenden Nematoden spezifisch mit Hilfe der Primer und der PCR-Technik identifiziert und amplifiziert wird.

Gegenstand der Erfindung sind dabei bevorzugt Oligonukleotide bestehend aus oder umfassend eine der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 12 bis SEQ ID NO. 51.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von DNA wie obengenannt zur Detektion von DNA aus Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus*, und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, die für  $\beta$ -Tubulin oder Fragmente davon kodiert, die resistent sind gegen Benzimidazole. Die Erfindung bezieht sich dabei auf Oligonukleotide wie oben genannt, die komplementär zu DNAs sind, die für  $\beta$ -Tubulin mit einer Resistenz gegen Benzimidazole kodieren bzw. zu den komplementären Strängen dieser DNA und die an diese DNA spezifisch hybridisieren können.

Die Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung dieser Oligonukleotide oder Teilen davon als

- a) Proben in Northern- oder Southern-Blot-Assays,
- b) PCR-Primer in einem diagnostischen Verfahren zur Detektion der oben genannten Nematoden mit einer Resistenz gegenüber Benzimidazolen, wobei die DNA der betreffenden Nematoden spezifisch mit Hilfe der Primer und der PCR-Technik identifiziert und amplifiziert wird.



Gegenstand der Erfindung sind dabei bevorzugt Oligonukleotide bestehend aus oder umfassend eine der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 12 bis SEQ ID NO. 51.

5 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Detektion von Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, wobei Oligonukleotide wie oben beschrieben an DNA-Sequenzen spezifisch hybridisieren, die aus den genannten Organismen stammen, und die mit Hilfe der PCR-Technik  
10 amplifiziert werden können. Die Hybridisierung erfolgt vorzugsweise in den nicht kodierenden Regionen des  $\beta$ -Tubulin-Gens (Introns).

Die Detektion von Organismen wie obengenannt kann z.B. erfolgen, indem man

- 15 a) eine Oligonukleotidprobe bzw. Primer zur Verfügung stellt, die an die oben genannte für  $\beta$ -Tubulin kodierende DNA oder dazu komplementäre Stränge oder an die 5'- oder 3'-flankierenden Regionen derselben hybridisieren können,
- 20 b) die Oligonukleotidprobe bzw. die Primer mit einer entsprechend aufbereiteten, DNA enthaltenden Probe in Kontakt bringt,
- c) die Hybridisierung des Oligonukleotids bzw. Primers detektiert (z.B. mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion),
- 25 d) die detektierte Sequenz des  $\beta$ -Tubulin-Gens sequenziert, und
- e) die Sequenz mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen vergleicht, die oben beschrieben wurden, bevorzugt mit DNA-Sequenzen gemäß SEQ ID  
30 NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Detektion von Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, die  
5 resistent gegen Benzimidazole sind, wobei Oligonukleotide wie oben beschrieben an DNA-Sequenzen spezifisch hybridisieren, die aus den genannten Organismen stammen, und die mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert werden können. Die Hybridisierung erfolgt vorzugsweise in den nicht kodierenden Regionen des  $\beta$ -Tubulin-Gens (Introns).

10 Die Detektion von Organismen wie obengenannt kann z.B. erfolgen, indem man

- a) eine Oligonukleotidprobe bzw. Primer zur Verfügung stellt, die an die oben genannte für  $\beta$ -Tubulin kodierende DNA oder dazu komplementäre Stränge  
15 oder an die 5'- oder 3'-flankierenden Regionen derselben hybridisieren können,
- b) die Oligonukleotidprobe bzw. die Primer mit einer entsprechend aufbereiteten, DNA enthaltenden Probe in Kontakt bringt,
- 20 c) die Hybridisierung des Oligonukleotids bzw. Primers detektiert (z.B. mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion),
- d) die detektierte Sequenz des  $\beta$ -Tubulin-Gens sequenziert, und  
25 e) die Sequenz mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen vergleicht, die oben beschrieben wurden, bevorzugt mit DNA-Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11, die mindestens eine Punktmutation in Kodon 200 aufweisen, die zu einer Resistenz des von diesen Sequenzen kodierten  
30  $\beta$ -Tubulins gegen Benzimidazole führt.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein diagnostischer Testkit zur Detektion und Identifizierung von Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, der unter anderem Oligonukleotide wie oben beschrieben zur Verfügung stellt, die in Verfahren zur Detektion der genannten Spezies verwendet werden können. Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls Oligonukleotide zur Verfügung, die spezifisch an Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11, dazu komplementäre Sequenzen, Sequenzen mit mindestens einer Punktmutation in Kodon 200, oder Fragmente dieser Sequenzen hybridisieren. Besonders bevorzugt sind dabei Oligonukleotide bestehend aus oder umfassend Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 12 bis SEQ ID NO. 51.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein diagnostischer Testkit zur Detektion von Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, mit einer Resistenz gegen Benzimidazole, der unter anderem Oligonukleotide wie oben beschrieben zur Verfügung stellt, die in Verfahren zur Detektion der genannten Spezies verwendet werden können. Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls Oligonukleotide zur Verfügung, die spezifisch an Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11, dazu komplementäre Sequenzen, Sequenzen mit mindestens einer Punktmutation in Kodon 200, oder Fragmente dieser Sequenzen hybridisieren. Besonders bevorzugt sind dabei Oligonukleotide bestehend aus oder umfassend Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 12 bis SEQ ID NO. 51.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein diagnostischer Testkit wie vorstehend beschrieben, wobei die in diesem Kit zur Verfügung gestellten Oligonukleotide mit einem detektierbaren Marker versehen sind. Solche detektierbaren Marker können

u.a. Enzyme beinhalten, Enzym-Substrate, Coenzyme, Enzyminhibitoren, Fluoreszenzmarker, Chromophore, lumineszente Marker und Radioisotope.

5 Gegenstand dieser Erfindung sind ebenfalls Antikörper, die spezifisch mit einem Epitop eines  $\beta$ -Tubulins aus Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum* reagieren.

10 Gegenstand dieser Erfindung sind ebenfalls besonders monoklonale Antikörper, die spezifisch mit einem Epitop eines  $\beta$ -Tubulins aus Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, reagieren.

15 Gegenstand dieser Erfindung ist ebenfalls die Verwendung der vorstehend genannten Antikörper als Nematizide.

20 Gegenstand dieser Erfindung ist auch die Verwendung der vorstehend genannten  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide oder Fragmente davon aus Nematoden der Familie der Strongylidae, bevorzugt der Subfamilie der Cyathostominae, besonders bevorzugt der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*, ganz besonders bevorzugt der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, zur Herstellung von Vakzinen, die mindestens eines der genannten  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide oder Fragmente davon  
25 enthalten. Das Vakzin ist dabei in der Lage, eine Immunantwort hervorzurufen, die spezifisch ist für ein vorstehend beschriebenes  $\beta$ -Tubulin.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Vakzin eine antigene Determinante, z.B. eine einzelne Determinante eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 oder 10 oder eines Polypeptids, das von einer der vorstehend genannten DNA oder Fragmenten davon kodiert wird.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung zur Immunisierung von Säugern, bestehend aus mindestens einem der vorstehend genannten erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide oder Fragmenten davon oder aus mindestens einem der vorstehend genannten Antikörper.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls die Verwendung der vorstehend beschriebenen Expressionsvektoren enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für ein erfindungsgemäßes  $\beta$ -Tubulin, bevorzugt eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1,3,5,7,9 oder 11, Fragmente davon oder dazu homologe Sequenzen zur Herstellung einer immunogene Zusammensetzung zur Verabreichung in einen Wirt zur Aktivierung einer protektiven Immunantwort in diesem Wirt, die auf  $\beta$ -Tubulin aus parasitären Nematoden gerichtet ist.

15

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls eine immunogene Zusammensetzung umfassend einen Vektor (umfassend eine für das erfindungsgemäße  $\beta$ -Tubulin kodierende Nukleinsäure, vorzugsweise eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11, Fragmente davon oder dazu homologe Sequenzen sowie eine Promotor-Sequenz, die funktionell mit besagter Nukleotidsequenz verknüpft ist und die die Expression des eine Immunantwort hervorrufenden erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulins steuert) und eine für pharmazeutische Zwecke geeignete Trägersubstanz.

20

Gegenstand dieser Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die die Interaktion von Tubulin bzw. die Interaktion von Untereinheiten des Tubulins modulieren. Das Verfahren beruht auf der Verwendung von Tubulin, bevorzugt auf Tubulin aus parasitischen Nematoden, besonders bevorzugt auf  $\beta$ -Tubulin aus parasitischen Nematoden der Ordnung Strongylida, ganz besonders bevorzugt auf  $\beta$ -Tubulin aus parasitischen Nematoden der Familie der Strongylidae, am meisten bevorzugt auf  $\beta$ -Tubulin aus parasitischen Nematoden der Subfamilie der Cyathostominae. Eine besonders bevorzugte Gruppe des in diesem Verfahren

25

30

verwendeten  $\beta$ -Tubulins ist  $\beta$ -Tubulin aus parasitischen Nematoden der Gattungen *Cylicocyclus* und *Cyathostomum*.

5 Die Erfindung bezieht sich auf das Identifizieren von Substanzen, z.B. kleinen organischen Molekülen, die in der Lage sind, die Interaktion von Tubulin-Proteinmolekülen bzw. dessen Untereinheiten miteinander zu modulieren. Bevorzugt bezieht sich die Erfindung auf das Identifizieren von Verbindungen, die die Interaktion inhibieren.

10 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren wie vorstehend beschrieben, das darauf beruht, daß man

- 15 a) die zu testende Substanz mit dem Tubulin in Kontakt bringt, wobei die gewählten Bedingungen die Interaktion der Tubulinmoleküle miteinander und die Bindung der Testsubstanz an Tubulin gestatten,
- b) die erfolgte Bindung detektiert, indem man die Fähigkeit der Tubulin-Proteinmoleküle zur Interaktion miteinander bestimmt und
- 20 c) die Fähigkeit der Tubulin-Proteinmoleküle zur Interaktion miteinander bei Anwesenheit einer Testsubstanz zur Fähigkeit der Interaktion miteinander bei Abwesenheit einer Testsubstanz vergleicht.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die die Fähigkeit von Tubulin-Molekülen zur Interaktion miteinander  
25 modulieren. Besonders bevorzugt bezieht sich die Erfindung dabei auf ein Verfahren, das eines der vorstehend beschriebenen Polypeptide verwendet, die von den vorstehend beschriebenen DNAs oder Fragmenten davon kodiert werden, besonders von DNAs bestehend aus oder umfassend Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7,  
30 9 oder 11 sowie von Sequenzen, die dazu eine Identität von 85 %, vorzugsweise

95 % aufweisen und für  $\beta$ -Tubulin kodieren, das eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ 2, 4, 6, 8 oder 10 besitzt.

5 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die die Fähigkeit von Tubulin zur Interaktion miteinander modulieren wie vorstehend beschrieben, wobei das verwendete Verfahren darauf beruht, eine Modulation der Tubulininteraktion bei Anwesenheit einer Testsubstanz mit Hilfe eines auf Zellen basierenden Testsystems zu detektieren. Eine bevorzugte Ausführungsform eines solchen Testsystems ist das sogenannte "Two Hybrid System"

10 (US 5 283 317, Zervos et al. (1993) Cell 72, 223-232; WO 94/10300). Dieses System ist geeignet, die Interaktion zweier Proteine zu dokumentieren oder zu beschreiben, indem die Interaktion zu einem detektierbaren Signal führt. Ein solches System kann auch an Testsysteme mit hohen Durchsatzzahlen angepaßt werden.

15 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die die Fähigkeit von Tubulin zur Interaktion miteinander modulieren, wobei das verwendete Verfahren darauf beruht, eine Modulation der Tubulininteraktion bei Anwesenheit einer Testsubstanz mit Hilfe eines zellfreien Testsystems zu detektieren. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform eines solchen Testsystems ist der sogenannte "Scintillation Proximity Assay" (SPA)

20 (EP 015 473). Dieses Testsystem beruht auf dem Nachweis einer Interaktion eines an Mikrokügelchen ("Microspheres") oder Perlen ("Beads") gebundenen Rezeptors, z. B. eines Tubulin-Moleküls, mit einem Liganden, wobei die Microspheres oder Beads mit einem szintillierenden Molekül versehen sind. Ein Signal wird dann detektiert,

25 wenn der Rezeptor-Ligand-Komplex zerfällt.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls bislang noch nicht beschriebene Substanzen, die mit Hilfe der vorstehend beschriebenen Verfahren identifiziert werden und geeignet sind, die Interaktion von Tubulinmolekülen zu modulieren, vorzugsweise zu inhibieren.

30

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von bislang noch nicht beschriebenen Substanzen, die mit einem der vorstehend beschriebenen Verfahren identifiziert wurden, zur Herstellung eines Mittels, das der prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Tieren oder Menschen dienen, die von Nematoden befallen werden können oder befallen wurden. Die erfindungsgemäßen Mittel enthalten mindestens eine der mit einem der vorstehend beschriebenen Verfahren identifizierten Substanzen und können nasal, dermal, parenteral oder enteral verabreicht werden.

10 Zum besseren Verständnis soll die Bedeutung bestimmter Wörter und Begriffe, die in der Beschreibung, den Beispielen und angefügten Ansprüchen verwendet werden, im Folgenden näher erläutert werden.

15 Der Begriff "Fragmente" in Bezug auf Proteine und DNA beschreibt Teile der unter den SEQ ID NO. 1 bis 11 beschriebenen Nukleinsäuren bzw. Aminosäuresequenzen, dazu komplementärer Sequenzen oder dazu zu 85 %, vorzugsweise zu 95 % identischer Sequenzen. Die Fragmente der DNA- und Polypeptidsequenzen umfassen mindestens 5 Nukleotide oder Aminosäuren, können aber ebenso bis zu 447 Aminosäuren oder bis zu 1343 Nukleotide, bzw. bis zu 2565 Nukleotide im Falle der Sequenz gemäß SEQ ID NO. 11 umfassen.

20 Die Begriffe "Homologie", "Identität" oder "Ähnlichkeit" beziehen sich auf Sequenz-ähnlichkeiten zwischen zwei Peptiden oder zwischen zwei Nukleinsäuremolekülen. Homologie kann bestimmt werden, indem man jeweils eine Position in jeder Sequenz miteinander vergleicht. Ist eine Position in der verglichenen Sequenz von derselben Base oder Aminosäure besetzt, sind die beiden Moleküle an dieser Position homolog. Das Maß für Homologie zwischen Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl der übereinstimmenden oder homologen Positionen, die die Sequenzen miteinander teilen. Eine "nicht homologe" Sequenz weist eine Identität von weniger als 40 % auf, 30 vorzugsweise allerdings weniger als 25 % Identität.



Der Begriff "Homologie" bedeutet im besonderen, daß DNA-Segmente von mindestens 15 Basenpaaren Länge oder zur DNA komplementäre Stränge in mindestens 85 %, vorzugsweise 95 % der Nukleotide mit der entsprechenden DNA übereinstimmen. Eine Homologie kann u.a. mit Hilfe von Computerprogrammen wie dem GCG-Programm (Devereux et al. (1983), Nucleic Acids Res. 12, 387-395) festgestellt werden.

Eine "Homologie" besteht auch, wenn ein DNA-Segment an den betreffenden DNA Strang oder dessen komplementären Strang hybridisieren kann.

10

Der Begriff "hybridisieren" oder "Hybridisierung" beschreibt den Vorgang, bei dem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären DNA-Strang eine Basenpaarung eingeht, wobei die Fähigkeit eines einzelsträngigen Nukleinsäuremoleküls von der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen abhängt.

15

Der Begriff "Stringenz" bezieht sich auf die Hybridisierungsbedingungen. "Hohe Stringenz" ist dann gegeben, wenn eine Basenpaarung erschwert wird. "Niedrige Stringenz" ist dann gegeben, wenn eine Basenpaarung erleichtert wird.

20

Der Begriff "komplementär" bezieht sich auf die Fähigkeit von Purin- und Pyrimidinnukleotiden über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander Basenpaare zu bilden. Komplementäre Basenpaare sind u.a. Guanin und Cytosin, Adenin und Thymin sowie Adenin und Uracil.

25

Der Fachmann ist sich darüber im Klaren, daß aufgrund des degenerierten genetischen Kodes (d.h. 64 Kodons kodieren für 20 Aminosäuren) zahlreiche "stille" Substitutionen von Nukleotidbasenpaaren in die hierfür aufgeführte Sequenz eingeführt werden können, ohne die Identität der davon kodierten Proteinprodukte zu verändern. Alle solche Substitutionen sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

30

Der Begriff "spezifisch hybridisieren" bezieht sich auf die Fähigkeit eines Nukleinsäuremoleküls der vorliegenden Erfindung, an mindestens etwa 6, 12, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300, 350, 400 oder 440 aufeinander folgende Nukleotide eines der vorstehend beschriebenen  $\beta$ -Tubulin-Gene zu hybridisieren, bevorzugt an eine der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 oder dazu homologe oder komplementäre Sequenzen, und zwar derart, daß 10fach mehr Moleküle hybridisieren, bevorzugt 100fach mehr Moleküle hybridisieren, und besonders bevorzugt mehr als 100fach mehr Moleküle hybridisieren als an eine zelluläre Nukleinsäure (z.B. mRNA oder genomische DNA), die für ein anderes Protein als das vorstehend beschriebene  $\beta$ -Tubulin kodiert.

Der Begriff "Plasmid" bezieht sich auf ein extrachromosomales genetisches Element. Die für die vorliegende Erfindung verwendeten Ursprungsplasmide sind entweder kommerziell erhältlich, frei zugänglich oder können von solchen Plasmiden nach bekannten Verfahren abgeleitet werden.

Der Begriff "Vektor" beschreibt ein DNA-Element, das zum Einbringen exogener DNA in Wirtszellen verwendet wird. Ein Vektor enthält eine Nukleotidsequenz, die für ein oder mehrere Polypeptide kodiert. Vektoren, die in der Lage sind, die Expression der Gene zu steuern, die sie enthalten, werden als "Expressionsvektoren" bezeichnet.

Der Begriff "Gen" bezieht sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf eine Nukleinsäure enthaltend ein offenes Leseraster, das für eines der vorstehend beschriebenen  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide kodiert. Dabei werden sowohl Exon- als auch evtl. Intron-Sequenzen mit eingeschlossen.

Der Begriff "interagieren" oder "Interaktion" beschreibt detektierbare Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Der Begriff "Bindung" wird dabei mit umfaßt.

Der Begriff "modulieren" bezieht sich sowohl auf eine Stimulation als auch auf eine Suppression oder Inhibition eines biochemischen Vorgangs. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bedeutet "Modulation" eine Inhibition oder Suppression der Interaktion zwischen Tubulin-Polypeptiden oder Fragmenten oder Untereinheiten davon, oder eine Stimulation dieser Interaktion, die sich z.B. in einer irreversiblen Bindung von Tubulin-Polypeptiden aneinander zeigen kann.

Der Begriff "Nukleinsäure" bezieht sich auf Polynukleotide wie Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder, falls angebracht, auf Ribonukleinsäuren (RNA). Der Begriff umfaßt auch in äquivalenter Weise Analoga von RNA oder DNA, die aus Nukleotidanaloga hergestellt werden, sowie im zutreffenden Fall einzelsträngige ("Sense" oder "Antisense") und doppelsträngige Polynukleotide.

Der Begriff "Promotor" bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die die Expression einer bestimmten DNA regulieren, die funktionell mit dem Promotor verknüpft sind. Der Begriff umfaßt auch "gewebsspezifische" Promotoren, d.h. Promotoren, die die Expression der spezifischen DNA nur in bestimmten Zellen (z.B. Zellen eines bestimmten Gewebes) steuern. Ebenso umfaßt sind "gewebsunspezifische" Promotoren und Promotoren, die zu einer konstitutiven Expression führen oder induzierbar sind.

Die Begriffe "Protein", "Polypeptid" und "Peptid" sind in ihrer Verwendung im Rahmen der vorliegenden Anmeldung austauschbar, wenn sie sich auf ein Genprodukt beziehen.

Ein "Fusionsprotein" ist eine Fusion einer ersten Aminosäuresequenz kodierend für eines der vorstehend beschriebenen  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide mit einer zweiten Aminosäuresequenz, die keine Gemeinsamkeit oder grundlegende Homologie zur Tubulin-Sequenz hat. Die zweite Aminosäuresequenz kann dabei aus demselben Organismus stammen wie die erste, oder alternativ aus einem anderen Organismus stammen (intergenisch). Im allgemeinen kann ein Fusionsprotein anhand der Formel X-Tubulin-Y wiedergegeben werden, wobei "Tubulin" für eines der vorstehend

beschriebenen Polypeptide steht, und X und Y für ein Polypeptid stehen, das nicht in Zusammenhang mit einer Tubulin-Aminosäuresequenz steht. X oder Y können jeweils unabhängig voneinander abwesend sein.

- 5 Die Begriffe "Zelle" oder "Wirtszelle" können im Rahmen der hier vorliegenden Anmeldung im gleichen Sinne verwendet werden. Es versteht sich, daß diese Begriffe sich nicht nur auf eine einzelne Zelle, sondern auch auf die Nachkommen einer solchen Zelle beziehen. Aufgrund bestimmter Modifikationen im Verlauf folgender Generationen (z.B. Mutationen), sind solche Nachkommen möglicherweise  
10 nicht mit der Stammzelle identisch, sind allerdings von der vorliegenden Erfindung mit umfaßt.

- Der Begriff "Intron" beschreibt solche Sequenzen der beschriebenen, vorzugsweise genomischen DNA, die transkribiert, dann aber aus dem Transkript durch sogenanntes "Splicing" entfernt werden, wobei die angrenzenden Sequenzen (Exons)  
15 verknüpft werden.

### Nukleinsäuren

- 20 Wie bereits beschrieben, bezieht sich ein Aspekt der Erfindung auf Nukleinsäuren aus Nematoden der Familie der Strongylidae, besonders der Subfamilie der Cyathostominae, ganz besondere auf die Gattungen *Cyathostomum* und *Cylicocyclus*, vor allem der Arten *Cylicocyclus nassatus* und *Cyathostomum coronatum*, die für  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide kodieren, oder Fragmente davon oder dazu  
25 homologe Nukleinsäuren, die den in SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 und 11 zu 85 %, vorzugsweise zu 95 % homolog sind und für ein  $\beta$ -Tubulin gemäß einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 oder 10 oder Fragmente davon kodieren. SEQ ID NO. 3 gibt die degenerierte Sequenz der für  $\beta$ -Tubulin kodierenden Nukleinsäure aus *Cylicocyclus nassatus* wieder, wobei "r" für ein Purin (Guanin oder  
30 Adenin) steht, "y" für ein Pyrimidin (Thymin bzw. Uracil oder Cytosin) und "w" für ein Adenin oder ein Thymin bzw. ein Uracil. SEQ ID NO. 3 umfaßt damit eine Reihe

von Sequenzen, die in Organismen der Spezies *Cylicocyclus nassatus* vorliegen können. Die Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 5, 7 und 11 zeigen drei definierte, für  $\beta$ -Tubulin kodierende Sequenzen, die beispielhafte und bevorzugte Ausführungsformen von DNA gemäß SEQ ID NO. 3 sind.

5

Teil der Erfindung sind ebenfalls Oligonukleotide, die gegebenenfalls für  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide kodieren, die eine Länge von mindestens 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 oder 400 Aminosäuren umfassen. Solche Oligonukleotide können als Primer oder Antisens-Moleküle (d.h. also als nicht-kodierende Nukleinsäuren)

10 dienen und mindestens etwa 6, 12, 24, 30, 60, 100, 120, 150 oder 210 Basenpaare umfassen, während kodierende Nukleinsäuren etwa 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200 oder 1300 Basenpaare umfassen.

15

Die Erfindung beschreibt auch solche Oligonukleotide, die spezifisch unter stringenten Bedingungen an Nukleinsäuren hybridisieren, die von einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 wiedergegeben werden. Entsprechend stringente Bedingungen sind z.B. 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem Waschschrift mit 2 x SSC bei 50°C, und sind dem Fachmann geläufig (siehe z.B. Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6). So können die Salzkonzentrationen im

20 Waschschrift so gewählt werden, daß die Stringenz geringer ist (2 x SSC, 50°C) oder höher ist (0,2 x SSC, 50°C). Weiterhin kann die Temperatur beim Waschschrift variiert werden, von Bedingungen für eine geringe Stringenz (z.B. ca. 22°C), bis hin zu Bedingungen hoher Stringenz (z. B. ca. 65°C). Sowohl Salzkonzentration als auch

25 Temperatur können variiert und aufeinander abgestimmt werden.

30

Besonders bevorzugte Oligonukleotide, die als Primer oder für eine Hybridisierung zur Identifizierung und Charakterisierung einer vorliegenden, z.B. genomischen, DNA verwendet werden können, sind in SEQ ID NO. 12-51 beschrieben. Es können jedoch auch andere Oligonukleotide aus den Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 abgeleitet werden, die dann als Primer bzw. zur Hybridisierung ver-

wendet werden können. Besonders bevorzugt zur Identifizierung der Spezies oder Gattung, der eine vorliegende DNA zugeordnet werden kann, sind solche Oligonukleotide, die im Bereich des Introns einer vorliegenden (genomischen) DNA hybridisieren. Die Introns einer für  $\beta$ -Tubulin kodierenden genomischen DNA, die aus den vorstehend genannten Nematoden isoliert werden kann, sind am Beispiel von *Cylicocyclus nassatus* in SEQ ID NO. 11 beschrieben. Die Introns sind also jene Sequenzen, die zwischen den kodierenden Exons lokalisiert sind. In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die beschriebenen Primer oder Hybridisierungs sonden eine markierte Gruppierung, die die Detektion der Oligonukleotide ermöglicht, so z.B. Radioisotope, fluoreszierende Gruppierungen, Enzyme oder Enzym-Cofaktoren.

Solche Oligonukleotide können in diagnostischen Test-Kits eingesetzt werden, um die Herkunft (d.h. den Organismus) einer vorliegenden DNA zu bestimmen. Die Oligonukleotide sind durch ihre spezifische Hybridisierung mit den unter SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 und 11 genannten DNAs deren Fragmenten, dazu homologen Sequenzen und dazu komplementären Sequenzen geeignet, definierte Sequenzen zu erkennen. Sie ermöglichen so auch die Erkennung und Identifizierung von solchen für  $\beta$ -Tubulin kodierenden Sequenzen, die aufgrund einer oder mehrerer Punktmutationen in Kodon 200 zur Expression von benzimidazolresistentem  $\beta$ -Tubulin führen. Diese von den Sequenzen SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 und 11 abgeleiteten Oligonukleotide, bevorzugt die unter SEQ ID NO. 12 bis 51 beschriebenen Ausführungsformen sind damit geeignet zur Identifizierung der häufig auftretenden Nematoden-Spezies der Subfamilie der Cyathostominae, sowie zur Erkennung bestehender Resistenzen gegen Benzimidazole.

Die Oligonukleotide gemäß der vorliegenden Erfindung können mit Standardmethoden, die dem Fachmann geläufig sind, hergestellt werden, z.B. durch de novo DNA-Synthese.

Die hier genannten Nukleinsäuren können in vollständigen Zellen, in Zell-Lysaten, in teilweise gereinigter oder biologisch reiner Form vorliegen, d.h. wenn andere Zellkomponenten bzw. chemische Vorläufer und Nebenprodukte im Falle einer chemischen Synthese der DNA abgetrennt wurden.

5

Für  $\beta$ -Tubulin kodierende Nukleinsäuren, wie vorstehend beschrieben, können ausgehend von mRNA gewonnen werden, die in einer Reihe eukaryontischer Zellen vorliegt. Es ist auch möglich, die erfindungsgemäße DNA ausgehend von genomischer DNA aus den betreffenden Nematodenzellen zu erhalten (siehe auch folgende Beispiele). Ein für  $\beta$ -Tubulin kodierendes Gen kann z.B. aus einer cDNA- oder einer genomischen DNA-Bibliothek gewonnen werden. cDNA kann erhalten werden, indem man die gesamte mRNA einer Zelle, z.B. einer Nematodenzelle, isoliert. Ausgehend von der mRNA kann dann doppelsträngige cDNA hergestellt werden und in ein passendes Plasmid oder einen passenden Vektor insertiert werden.

10

Die erfindungsgemäße DNA kann auch erhalten werden durch Amplifikation mit Hilfe der bekannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder auch durch de novo-DNA-Synthese (siehe auch J. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, 2. Auflage, Kap. 14).

15

## 20 Vektoren und Plasmide

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Expressionsvektoren, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten, die funktionell mit einer transkriptionsregulatorischen Sequenz verknüpft sind. "Funktionell verknüpft" bedeutet, daß die Nukleinsäuresequenz in einer Weise mit der regulatorischen Sequenz verknüpft ist, daß die Expression des von der Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins gesteuert werden kann. "Transkriptionsregulatorische Sequenzen" umfassen z. B. Promotoren, Enhancer und andere Kontrollelemente. Die Expressionsvektoren enthalten z. B. ein Gen kodierend für ein erfindungsgemäßes  $\beta$ -Tubulin oder Fragmente davon. Diese Vektoren können verwendet werden, um in Zellen eingebracht zu werden, wo dann die entsprechenden Polypeptide oder auch Fusionsproteine entstehen. Passende Pro-

25

30

motoren zur Expression des erfindungsgemäßen Proteins in *E.coli* umfassen natürliche Hybrid- oder Bakteriophagenpromotoren. Bevorzugt handelt es sich um Promotoren aus der Gruppe der Phage  $\lambda$ -Promotoren, um omp- oder synthetische Promotoren (siehe auch WO 98/15625, DE 3 430 683, EP 0 173 149). Geeignete

5 Vektoren sind kommerziell erhältlich, z.B. die Expressionsvektoren der pET-Serie (z.B. pET3a, pET23a, pET28a und His-Tag oder pET32a mit His-Tag) oder pGEX mit Glutathionsynthetase-Fusion. Die Expressionsvektoren können dann z.B. in DE3-lysogene E.coli-Stämme, z.B. BL21(DE3), HM S 174(DE3) oder AD494(DE3) transformiert werden.

10



### Expression der $\beta$ -Tubulin-Polypeptide

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Zellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten (z.B. in einem Vektor oder in das Genom insertiert). Diese Wirtszellen können prokaryontisch oder eukaryontisch sein.

Passende prokaryontische Expressionssysteme sind z.B. bakterielle Systeme wie *Streptomyces* spp., *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* und bevorzugt *E.coli*.

Ein bevorzugtes eukaryontisches Expressionssystem ist das Baculovirussystem, besonders bevorzugt jenes, das posttranslationale Modifikationen gestattet.

Andere eukaryontische Expressionssysteme (z.B. Hefe, Insektenzellen) können ebenfalls benutzt werden.

### Polypeptide

Die vorliegende Erfindung umfaßt ebenfalls  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen DNAs, vorzugsweise den DNA-Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 und 11 kodiert werden, von Fragmenten derselben oder von homologen DNA-Sequenzen wie vorstehend beschrieben. Bevorzugte Ausführungsformen dieser  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide sind in den Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 und 10 beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den beschriebenen Polypeptiden um aufgereinigte Polypeptide, die frei sind von kontaminierenden Proteinen jener Zellen, in denen die erfindungsgemäßen Polypeptide produziert wurden.

Bei den beschriebenen Polypeptiden handelt es sich um Proteine voller Länge oder um Fragmente, Motive oder Domänen davon, die Längen von mindestens 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350 oder 400 Aminosäuren umfassen.

Polypeptidfragmente können erhalten und ausgewählt werden durch das Testen von Polypeptiden, die von Nukleinsäurefragmenten abgeleitet aus den Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 und 11 kodiert werden.

- 5 Polypeptidfragmente können auch auf bekannte Weise chemisch synthetisiert werden.

10 Die Erfindung umfaßt auch Polypeptide, die von der degenerierten Sequenz gemäß SEQ ID NO. 3 kodiert werden. Durch die verschiedenen möglichen Basen an definierten Positionen der DNA-Sequenz ergeben sich verschiedene Polypeptide mit vom jeweils sich ergebenden Kodon kodierten Aminosäure. Die von DNA gemäß SEQ ID NO. 3 kodierten Polypeptide sind in SEQ ID NO. 4 beschrieben, wobei die variablen Aminosäuren durch "Xaa" gekennzeichnet sind.

- 15 Bevorzugte Ausführungsformen der Polypeptide sind in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 und 10 beschrieben.

20 Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide.

Dem Fachmann ist bekannt, daß die Polypeptide der vorliegenden Erfindung auf verschiedenem Wege gewonnen werden können, z.B. durch chemische Methoden wie der Festphasenmethode. Zur Gewinnung größerer Proteinmengen empfiehlt sich die Verwendung rekombinanter Methoden.

25

Die grundlegenden Schritte zur Herstellung des rekombinanten  $\beta$ -Tubulins sind:

1. Gewinnung einer natürlichen, synthetischen oder semi-synthetischen DNA, die für das erfindungsgemäße  $\beta$ -Tubulin kodiert.

30

2. Einbringen dieser DNA in einem Expressionsvektor, der geeignet ist, das erfindungsgemäße  $\beta$ -Tubulin zu exprimieren, entweder alleine oder als Fusionsprotein.
- 5 3. Transformation einer passenden, vorzugsweise prokaryontischen Wirtszelle mit diesem Expressionsvektor.
4. Anzucht dieser transformierten Wirtszelle in einer Weise, die geeignet ist, das erfindungsgemäße  $\beta$ -Tubulin zu exprimieren.
- 10 5. Ernte der Zellen und Aufreinigung des  $\beta$ -Tubulins durch geeignete, bekannte Methoden.

Zum Beispiel können die Expressionsvektoren in  $\lambda$ DE3-lysogene *E. coli*-Stämme, z.B. BL21(DE3), HM S174(DE3) oder AD494(DE3) transformiert werden. Nach dem Anwachsen der Zellen unter dem Fachmann geläufigen Standardbedingungen wird die Expression mit IPTG induziert. Nach Induktion der Zellen wird für 3 bis 24 Stunden bei Temperaturen von 18 bis 37°C inkubiert. Die Zellen werden aufgeschlossen, das exprimierte Protein über chromatographische Methoden gereinigt, im Fall von mit His-Tag exprimiertem Protein durch FPLC an einer Ni-NTA-Säule, sowie durch Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, Ultrafiltration, Elektrophorese oder auch Immunoaffinitäts-Aufreinigung, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch sind.

25

Homologe oder Fragmente der erfindungsgemäßen Polypeptide können durch Mutagenese generiert werden, wie z.B. durch gerichtete (Punkt-)Mutagenese, oder durch Deletionen.

30

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch chemisch modifiziert werden, z.B. mit Glycosyl-Gruppen, Lipiden, Phosphaten, Acetylgruppen oder ähnlichen

Gruppen. Kovalente Derivate können durch die Verknüpfung der modifizierenden Gruppe mit funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten oder dem N-Terminus oder C-Terminus des Polypeptids erhalten werden.

- 5 Bei der Expression der Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung kann es von Vorteil sein, bestimmte Kodons zu verändern, um eine optimale Expression zu ermöglichen. Dies gilt dann, wenn die Verwendung bestimmter Kodons ("Codon usage") im heterologen Expressionssystem anders ist als in einem der erfindungsgemäßen Organismen. Weiterhin ist die Deletion der 5'- oder 3'-untranslatierten Region  
10 möglich, z.B. wenn mehrere destabilisierende Sequenzmotive (z.B. ATTTA) in der 3'-Region der cDNA vorliegen.

#### Fusionsproteine

- 15 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch als Teil eines Fusionsproteins vorliegen. Solche Fusionsproteine werden von der vorliegenden Erfindung voll umfaßt. Fusionsproteine können nützlich sein unter Bedingungen, wo es wünschenswert ist, ein immunogenes Fragment des  $\beta$ -Tubulins zu erhalten (siehe z.B. EP 0 259 149; Schlienger et al. (1992) J. Virol. 66, 2). Fusionsproteine erleichtern unter bestimmten  
20 Umständen die Expression eines Polypeptids. Zum Beispiel können die erfindungsgemäßen Polypeptide als Glutathione-S-Transferase (GST-) Fusions-Proteine hergestellt werden. Solche GST-Fusions-Proteine ermöglichen eine leichte Aufreinigung des Polypeptids (siehe z.B. Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons, N.Y. 1991). Fusionsproteine können z.B. eine "Leader"-  
25 Sequenz enthalten, die der Aufreinigung dient, z.B. erlaubt eine Poly-His-Sequenz am N-Terminus (aber auch am C-Terminus) des Proteins dessen Aufreinigung mittels Chromatographie an einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule (siehe z.B. Hachuli et al. (1987) J. Chromatography 411, 177).

- 30 Techniken zum Herstellen solcher Fusionsproteine sind dem Fachmann geläufig.

### Antikörper

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf Antikörper, die spezifisch mit dem erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulin-Polypeptiden reagieren.

5

Zum Beispiel können durch die Nutzung von Immunogenen, die von erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulin-Polypeptiden abgeleitet wurden, Anti-Protein- bzw. Anti-Peptid-Antisera oder monoklonale Antikörper nach Standardprotokollen hergestellt werden (siehe z.B. Antibodies: A. Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, 1988)).

10

15

Säuger wie Mäuse, Hamster oder Kaninchen können mit einer immunogenen Form oder einem immunogenen Anteil des erfindungsgemäßen Polypeptids immunisiert werden, also mit einem Polypeptid, das in der Lage ist, eine Antikörper-Antwort hervorzurufen (siehe auch "Fusionsproteine" oben). Die entsprechenden Techniken sind dem Fachmann geläufig. So kann ein immunogener Anteil des  $\beta$ -Tubulins in der Gegenwart eines Adjuvants verabreicht werden. Der Verlauf der Immunisierung kann durch Kontrolle des Antikörper-Titers in Plasma oder Serum beobachtet werden, z.B. durch gängige ELISA- oder andere Immuno-Assays.

20

25

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Antikörper immunspezifisch für eine antigene Determinante eines erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulin-Polypeptids, z.B. eines Polypeptids gemäß SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 oder 10 oder solcher Polypeptide, die von DNAs gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 oder damit zu 85 % identischer Sequenzen, bevorzugt zu 95 % identischer Sequenzen kodiert werden.

30

Nach der Immunisierung eines Säugers können polyklonale Anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper aus dem Serum isoliert werden. Zur Herstellung monoklonaler Antikörper können Antikörper-produzierende Zellen (Lymphocyten) von einem immunisierten Tier gewonnen werden und gemäß bekannten Methoden mit immortalen Zellen wie

Myeloma-Zellen fusioniert werden, um Hybridoma-Zellen zu erhalten (siehe z.B. Köhler und Milstein (1975) Nature 256, 495-497; Kozbar et al. (1983) Immunology Today 4, 72; Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96).

5

Die hier genannten "Antikörper" sollen auch Fragmente von Antikörpern umfassen, die spezifisch mit erfindungsgemäßem  $\beta$ -Tubulin reagieren. Antikörper können mit konventionellen Techniken fragmentiert werden und die Fragmente überprüft werden.

10

Eine bevorzugte Ausführungsform bezieht sich auf Antikörper wie vorstehend beschrieben, die einen detektierbaren Marker tragen (z.B. Radioisotope, fluoreszierende Gruppen, Enzyme oder Enzym-Cofaktoren).

15

Antikörper, die spezifisch an erfindungsgemäße  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide binden, können auch zur immunhistochemischen Färbung von Gewebeproben verwendet werden, um die Expression eines bestimmten  $\beta$ -Tubulins zu detektieren. Die Anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper können ebenso für diagnostische Zwecke, z.B. zur Immuno-präzipitation oder zum Immuno-Blotting verwendet werden.

20

#### Diagnostische Testverfahren

Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung, die zu diagnostischen Zwecken verwendet werden können.

25

Dazu gehören Nukleinsäuremoleküle wie vorstehend beschrieben, die Fragmente der unter SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 beschriebenen oder dazu komplementäre DNA-Sequenzen. Beispielhaft werden Oligonukleotide gemäß SEQ ID NO. 12 bis 51 zur Verfügung gestellt, die in der Lage sind, an Sens- oder Antisens-Sequenzen kodierend für  $\beta$ -Tubulin zu hybridisieren, sowie an intronische Sequenzabschnitte, die beispielhaft in SEQ ID NO. 11 beschrieben sind.

30

Dabei wird die Nukleinsäure einer Zelle zugänglich für die Hybridisierung gemacht, die DNA-Probe mit den Oligonukleotiden in Kontakt gebracht, und die Hybridisierung der Probe mit dem Oligonukleotid detektiert.

5

Auf diese Weise wird eine Methode zur Verfügung gestellt, die es ermöglicht, durch die spezifische Hybridisierung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide an eine DNA-Probe, vorzugsweise mit Hilfe solcher Oligonukleotide, die an die intronischen Bereiche der für  $\beta$ -Tubulin kodierenden DNA hybridisieren, zwischen verschiedenen Spezies kleiner Strongyliden und/oder anderen Nematoden-Spezies zu unterscheiden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform gestatten die erfindungsgemäßen Oligonukleotide die Identifizierung von Resistenzen bei kleinen (Cyathostaminae), z.B. bei Pferden, vor allem Resistenzen der Spezies *Cylicocyclus nassatus*, *Cyathostomum coronatum* und *Cyathostomum catinatum*. Dabei kann der Umstand genutzt werden, daß resistente Formen des  $\beta$ -Tubulins mindestens eine Punktmutation in der dafür kodierenden erfindungsgemäßen DNA tragen, die mittels PCR detektiert werden kann, wie z. B. in analoger Weise beschrieben bei Elard et al. (1998) PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or -resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. Veterinary Parasitology 80, 231-237.

15  
20

Die beschriebene Methode ist besonders hilfreich zur Beurteilung möglicher Behandlungsstrategien bei mit Nematoden befallenen Menschen und Tieren wie z.B. Pferden, Schafen, Schweinen, Ziegen, Kamelen, Büffeln, Eseln, Hasen, Rehwild, Pelztieren, Vögeln (z.B. Hühnern, Puten, Enten), Süß- und Salzwasserfischen (z.B. Forellen, Karpfen). Sie ermöglicht die Identifizierung und Unterscheidung der parasitären Nematoden sowie die Erkennung resistenter Populationen derselben, und vermeiden eine Behandlung mit unwirksamen Nematiziden.

25

Die hier beschriebenen Methoden können z.B. in Form vorgefertigter Diagnose-Testkits zur Verfügung gestellt werden, die zumindest eines der oben genannten

30

Nukleinsäuremoleküle oder einen Antikörper wie vorstehend beschrieben enthalten, der gebrauchsfertig vorbereitet ist.

#### Verfahren zum Auffinden von nematiziden Substanzen

5

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, bei dem mit Hilfe von Tubulin oder Fragmenten davon neuartige, spezifische anthelmintische Substanzen identifiziert werden können.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform werden dazu  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet. Das Verfahren kann jedoch auch mit Tubulin aus anderen als den hier genannten Spezies durchgeführt werden. Verfahren, die andere als die erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide verwenden, sind von der vorliegenden Erfindung voll umfasst. Besonders bevorzugt werden für das genannte

15

Verfahren  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide gemäß SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8 oder 10 verwendet. In der vorliegenden Erfindung werden also zusätzlich rekombinante  $\beta$ -Tubulin-Polypeptide aus häufig auftretenden parasitären Nematoden zur Verfügung gestellt. Diese können in verschiedenen Testsystemen zum Identifizieren neuer Inhibitoren der Tubulin-Interaktion, bzw. der Interaktion der Tubulin-

20

Untereinheiten genutzt werden.

#### Zellfreie Testsysteme

25

Viele Testsysteme, die die Prüfung von Verbindungen und natürlichen Extrakten zum Ziel haben, sind auf hohe Durchsatzzahlen ausgerichtet, um die Zahl der untersuchten Substanzen in einem gegebenen Zeitraum zu maximieren. Testsysteme, die auf zellfreiem Arbeiten beruhen, brauchen gereinigtes oder semi-gereinigtes Protein. Sie sind geeignet für eine "erste" Prüfung, die in erster Linie darauf abzielt, einen möglichen Einfluß einer Substanz auf das Zielprotein zu detektieren.

30



Effekte wie Zelltoxizität werden in diesen *in vitro* Systemen in der Regel ignoriert. Die Testsysteme überprüfen dabei sowohl inhibierende bzw. suppressive Effekte der Substanzen, als auch stimulatorische Effekte. Die Effektivität einer Substanz kann durch konzentrationsabhängige Testreihen überprüft werden. Kontrollansätze ohne  
5 Testsubstanzen können zur Bewertung der Effekte herangezogen werden.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Substanzen, die die Interaktion von Tubulin bzw. dessen Untereinheiten modulieren, ist der sogenannten "Scintillation Proximity Assay" (SPA), siehe EP 015 473. Dieses Testsystem nutzt die Interaktion eines  
10 Rezeptors (z.B. Tubulin) mit einem radiomarkierten Liganden (z.B. ein kleines organisches Molekül oder ein zweites, radioaktiv markiertes Proteinmolekül). Der Rezeptor ist dabei an kleine Kügelchen ("Microspheres") oder Perlen ("Beads") gebunden, die mit szintillierenden Molekülen versehen sind. Im Verlauf des Abfalls der Radioaktivität wird die szintillierende Substanz im Kügelchen durch die  
15 subatomaren Partikel des radioaktiven Markers angeregt und ein detektierbares Photon emittiert. Die Testbedingungen werden so optimiert, daß nur jene vom Liganden ausgehenden Partikel zu einem Signal führen, die von einem an den Rezeptor bzw. das Tubulin gebundenen Liganden ausgehen.

20 In einer möglichen Ausführungsform ist Tubulin an die Beads gebunden, entweder zusammen oder ohne interagierende bzw. bindende Testsubstanzen. Verwendet werden könnten dabei  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten. Ein radioaktiv markierter Ligand könnte z. B. ein markiertes Benzimidazol oder ein weiteres, markiertes  $\beta$ -Tubulin-Molekül sein. Bei einer Bindung des Liganden an das immobilisierte  
25 Tubulin, müßte dieser Ligand eine bestehende Interaktion zwischen immobilisiertem und freiem Tubulin inhibieren oder aufheben, um selbst im Bereich der Kontaktfläche zu binden. Eine erfolgte Bindung an das immobilisierte Tubulin kann dann anhand eines Lichtblitzes detektiert werden. Entsprechend wird ein bestehender Komplex zwischen einem immobilisierten und einem freien, markierten Tubulin  
30 durch die Bindung einer Testsubstanz zerstört, was zu einem Abfall der detektierten

Lichtblitzintensität führt. Das Testsystem entspricht dann einem komplementären Inhibitions-System.

#### Auf Zellen basierendes Testsystem

5

Das durch die vorliegende Erfindung verfügbare  $\beta$ -Tubulin, aber auch Tubulin aus anderen Spezies, ermöglicht die Entwicklung von Testsystemen, die auf Zellen basieren, zur Identifizierung von Substanzen, die die Tubulin-Interaktion inhibieren.

10

Ein Beispiel für ein solches Testsystem ist das sogenannte "Two Hybrid System". Ein spezifisches Beispiel dafür ist die sogenannte "Interaction Trap", die Interaktions-Falle. Es handelt sich dabei um eine genetische Selektion von interagierenden Proteinen in Hefe (siehe z.B. Gyuris et al. (1993) Cdi 1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk 2. Cell 75, 791-803). Das Testsystem ist darauf ausgelegt, die Interaktion zweier Proteine zu detektieren und zu beschreiben, indem eine erfolgte Interaktion zu einem detektierbaren Signal führt.

15

Ein solches Testsystem kann auch an die Prüfung großer Zahlen von Testsubstanzen in einem gegebenen Zeitraum angepaßt werden.

20

Das System beruht auf der Konstruktion zweier Vektoren, dem "Bait"- und dem "Prey"-Vektor. Ein für Tubulin, bevorzugt ein für ein erfindungsgemäßes  $\beta$ -Tubulin kodierendes Gen wird in den Bait-Vektor kloniert und dann als Fusionsprotein mit dem LexA-Protein, einem DNA-bindenden Protein, exprimiert. Ein zweites Gen, kodierend für Tubulin, vorzugsweise für ein erfindungsgemäßes  $\beta$ -Tubulin, wird in den Prey-Vektor kloniert, wo es als Fusionsprotein mit dem B42-Prey-Protein exprimiert wird. Beide Vektoren liegen in einem *Saccharomyces cerevisiae*-Wirt vor, der Kopien von LexA-bindender DNA auf der 5'-Seite eines lacZ- oder HIS3-Reportergens enthält. Findet eine Interaktion zwischen den beiden Tubulin-(Fusions-)Proteinen statt, kommt es zur Aktivierung der Transkription des Reportergens. Führt die Anwesenheit einer Testsubstanz zur Inhibition oder zur

25

30

Störung der Tubulin-Interaktion, können die beiden Tubulin-(Fusions-)Proteine nicht mehr interagieren, das Produkt des Reportergens wird nicht mehr hergestellt.

5 Mit Hilfe von Tubulin, besonders des erfindungsgemäßen  $\beta$ -Tubulins oder Fragmenten davon, und der vorstehend beschriebenen Verfahren, ist es möglich, neue und spezifische antiparasitische Verbindungen zu identifizieren.

Verbindungen, die mit Hilfe der beschriebenen Verfahren und Polypeptide gefunden werden, sind wertvoll zur Behandlung von Tieren und Menschen, die mit pathogenen  
10 Endoparasiten des Menschen oder von Nutztieren, Hobbytieren, Zootieren sowie Labor- und Versuchstieren infiziert sind.

Die Verbindungen sind wirksam gegen alle Entwicklungsstadien normaler, sensitiver  
15 Stämme und auch resistenter Stämme. Durch die Behandlung mit Mitteln, die eine oder mehrere dieser Verbindungen enthalten, können sowohl wirtschaftliche Verluste bei Nutztieren und Krankheiten bei Menschen und Tieren vermieden oder behandelt werden. Die folgenden Parasiten sind dabei von besonderem Interesse als Ziele der gefundenen Wirkstoffe:

20 Enoplida, z.B. *Trichuris* spp., *Capillaria* spp., *Trichomosoides* spp., *Trichinella* spp.  
Rhabditia, z.B. *Micronema* spp., *Strongyloides* spp.  
Strongylida, z.B. *Strongylus* spp., *Triodontophorus* spp., *Oesophagodontus* spp.,  
*Trichonema* spp., *Gyalocephalus* spp., *Cylindropharynx* spp., *Poteriostomum* spp.,  
*Cyclococercus* spp., *Cylicostephanus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Chabertia* spp.,  
25 *Stephanurus* spp., *Ancylostoma* spp., *Uncinaria* spp., *Bunostomum* spp., *Globocephalus* spp.,  
*Syngamus* spp., *Cyathostomum* spp., *Cylicocyclus* spp., *Neostrongylus* spp.,  
*Cystocaulus* spp., *Pneumostrongylus* spp., *Spicocaulus* spp., *Elaphostrongylus* spp.,  
*Parelaphostrongylus* spp., *Crenosoma* spp., *Paracrenosoma* spp., *Angiostrongylus* spp.,  
*Aelurostrongylus* spp., *Filaroides* spp., *Parafilaroides* spp., *Tricho-*  
30 *strongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Marshallagia* spp., *Cooperia*

- spp., *Nematodirus* spp., *Hyostrongylus* spp., *Obeliscoides* spp., *Amidostomum* spp., *Ollulanus* spp.
- Oxyurida, z.B. *Oxyuris* spp., *Enterobius* spp., *Passalurus* spp., *Syphacia* spp., *Aspiculuris* spp., *Heterakis* spp.
- 5 Ascaridia, z.B. *Ascaris* spp., *Toxascaris* spp., *Toxocara* spp., *Parascaris* spp., *Anisakis* spp., *Ascaridia* spp.
- Spirurida, z.B. *Gnathostoma* spp., *Physaloptera* spp., *Thelazia* spp., *Gongylonema* spp., *Habronema* spp., *Parabronema* spp., *Draschia* spp., *Dracunculus* spp.
- Filariida, z.B. *Stephanofilaria* spp., *Parafilaria* spp., *Setaria* spp., *Loa* spp.,
- 10 Dirofilaria spp., *Litomosoides* spp., *Brugia* spp., *Wuchereria* spp., *Onchocerca* spp.
- Gigantorhynchida, z.B. *Filicollis* spp., *Moniliformis* spp., *Macracanthorhynchus* spp., *Prosthenorchis* spp.
- Mastigophora (Flagellata)
- Trypanosomatidae, z.B. *Trypanosoma b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. evansi*, *T. equinum*, *T. lewisi*, *T. percae*, *T. simiae*, *T. vivax*, *Leishmania brasiliensis*, *L. donovani*, *L. tropica*
- 15 Trichomonadidae, z.B. *Giardia lambilia*, *G. canis*.
- Sarcomastigophora (Rhizopoda), z.B. *Entamoeba histolytica*
- Hartmanellidae, z.B. *Acanthamoeba* sp., *Hartmanella* spp.
- 20 Apicomplexa (Sporozoa), z.B. *Eimeria acervulina*, *E. adenoides*, *E. alabamensis*, *E. anatis*, *E. anseris*, *E. arloingi*, *E. ashata*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. brunetti*, *E. canis*, *E. chinchillae*, *E. clupearum*, *E. columbae*, *E. contorta*, *E. crandalis*, *E. deblickei*, *E. dispersa*, *E. ellipsoides*, *E. falciformis*, *E. faurei*, *E. labbeana*, *E. leucarti*, *E. magna*, *E. maxima*, *E. media*, *E. meleagridis*, *E. meleagrimitis*, *E. mitis*,
- 25 *E. necatrix*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. ovis*, *E. parva*, *E. pavonis*, *E. perforans*, *E. phasani*, *E. piriformis*, *E. praecox*, *E. residua*, *E. scabra*, *E. spec.*, *E. stiedai*, *E. suis*, *E. tenella*, *E. truncata*, *E. truttae*, *E. zuernii*, *Globidium spec.*, *Isospora belli*, *I. canis*, *I. felis*, *I. ohioensis*, *I. rivolta*, *I. spec.*, *I. suis*, *Neospora caninum*, *Cystispora spec.*, *Cryptosporidium spec.*
- 30 Toxoplasmodidae, z.B. *Toxoplasma gondii*

Sarcocystidae, z.B. *Sarcocystis bovicanis*, *S. bovi-hominis*, *S. neuvona*, *S. ovicanis*, *S. ovifelis*, *S. spec.*, *S. sui-hominis*

Leucozoide, z.B. *Leucozytozoon simondi*

5 Plasmodiidae, z.B. *Plasmodium berghei*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. spec.*

Piroplasmae, z.B. *Babesia argentina*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. spec.*, *Theileria parva*, *T. spec.*

Adeleina, z.B. *Hepatozoon canis*, *H. spec.*

10 Weiterhin von Bedeutung sind

Myxospora und Microspora, z.B. *Glugea spec.* und *Nosema spec.*, sowie *Pneumocystis carinii*, Ciliophora (Ciliata), z.B. *Balantidium coli*, *Ichtiophthirius spec.*, *Trichondina spec.* oder *Epistylis spec.*

15

Die gefundenen Verbindungen und Mittel sind ebenfalls effektiv gegenüber Protozoen von Insekten, wie solche des Stammes Microsporidia, besonders solche der Ordnung Nosema, ganz besonder solche der Art Nosema apis, die Parasiten der Honigbiene sind.

## Beispiele

### Beispiel 1

#### 5 Gewinnung von $\beta$ -Tubulin-cDNA und genomischer DNA

mRNA wurde mit Hilfe des Quick Prep<sup>®</sup> Micro mRNA Kits (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) aus *C. nassatus*-Würmern und aus *C. coronatum*- und *C. catinatum*-Würmern mit dem Dynal<sup>®</sup> mRNA Direct Kit (Dynal, Hamburg, 10 Deutschland) gewonnen. Die Würmer wurden aus dem Dickdarm von Pferden isoliert und mikroskopisch gemäß der charakteristischen Struktur von Kopf und Schwanz differenziert (siehe R. S. Lichtenfeld (1975), Helminths of domestic equids. Proceedings of the Helminthological Society, Washington, 42 (Special issue), 1-92).

15 Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des "Reverse Transkription System" (Promega, Madison, USA) im Falle der mRNA aus *C. nassatus* und mit der Superscript RT II Reverse Transcriptase (Gibco BRL Life Technologies) im Falle der mRNA aus *C. coronatum* und *C. catinatum*. In den genannten Fällen wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 15 Basenpaaren verwendet. Die Inkubation erfolgte 20 für eine Stunde bei 42°C.

Genomische DNA wurde aus 4 bis 40 erwachsenen Würmern mit dem QIA Amp-Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Dabei wurden die Würmer für 2 Stunden bei 55°C mit Proteinase K verdaut und die genomische DNA mit "Spin 25 Columns" extrahiert.

## Beispiel 2

### Amplifikation von $\beta$ -Tubulin-Sequenzen

- 5 Die Amplifikation von  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen voller Länge oder von Fragmenten kann z.B. mit AmpliTaq Gold™ Polymerase (Perkin Elmer, Foster City, California, USA) erfolgen.

10 Eine Amplifikation der  $\beta$ -Tubulin-Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 oder Fragmenten davon kann mit Hilfe der Primer gemäß SEQ ID NO. 12 - 51 erfolgen.

Für die Amplifikation der cDNA von *C. coronatum* eignen sich z.B. die Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 43 und 44, für die Amplifikation der cDNA von *C. catinatum*  
15 eignen sich besonders die Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 40 und 42.

Die Amplifikation der *C. nassatus* cDNA und der genomischen DNA aller Spezies gemäß der vorliegenden Erfindung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l, enthaltend 5  $\mu$ l 10 x Puffer, 2,5  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM), 2  $\mu$ l dNTP-Mix (2mM je NTP),  
20 1  $\mu$ l jedes spezifischen Primers (SEQ ID NO. 12 - 47) (50 p mol/ $\mu$ l), 0,5  $\mu$ l (2,5 U) Polymerase und 1 - 5  $\mu$ l DNA-Template. Bei der Verwendung degenerierter Primer (SEQ ID NO. 48 - 51) wurden 1  $\mu$ l jedes Primers einer Konz. von 500 pmol/ $\mu$ l eingesetzt. Das Annealing erfolgte im Falle degenerierter Primer bei 46°C, bei spezifischen Primern wurde die Temperatur entsprechend der berechneten  
25 Schmelztemperatur variiert. Die PCR-Zyklen wurden wie folgt gewählt:

95°C für 10 min, dann 35 - 40 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing, 1 min bei 72°C und ein abschließender Schritt bei 72°C für 10 min. Bei  
30 der Amplifikation von cDNA aus *C. coronatum* und *C. catinatum* wurde ein sogenanntes "Touchdown" PCR-Temperaturprogramm durchgeführt, das folgendes Profil hat:

- zunächst 15 Zyklen mit 94°C für 30 sec, dann 1 min bei 60°C und 1 min bei 72°C, gefolgt von 15 Zyklen mit 30 sec bei 95°C, 55°C für 1 min und 72°C für 1 min und schließlich 10 Zyklen bei 95°C für 30 sec, dann 45°C für 1 min und 72°C für 1 min. Für die Amplifikation größerer Fragmente (>1000 Basenpaare) wurde die Elongationsphase bei 72°C auf 2.30 min verlängert.
- 5

### Beispiel 3

- PCR-Produkte aus der Amplifikation von cDNA oder genomischer DNA aus *C. nassatus*, *C. coronatum* und *C. catinatum* wurden mit Hilfe des "Original TA Cloning Kit" (Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert, und zwar in den "Original TA Cloning®"-Vektor.
- 10



**Patentansprüche**

1. DNA kodierend für  $\beta$ -Tubulin aus Cyathostominae oder Fragmente davon.
- 5 2. DNA gemäß Anspruch 1, umfassend
  - a) ein Polynukleotid mit mindestens 85% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2;
  - 10 b) ein Polynukleotid mit mindestens 85% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 4;
  - c) ein Polynukleotid mit mindestens 85% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 6;
  - 15 d) ein Polynukleotid mit mindestens 85% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 8;
  - e) ein Polynukleotid mit mindestens 85% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 10.
  - 20
3. DNA gemäß Anspruch 1, umfassend
  - a) ein Polynukleotid mit mindestens 95% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2;
  - 25 b) ein Polynukleotid mit mindestens 95% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 4;
  - c) ein Polynukleotid mit mindestens 95% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 6;
  - 30

- d) ein Polynukleotid mit mindestens 95% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 8;
- 5 e) ein Polynukleotid mit mindestens 95% Identität zu einem Polynukleotid kodierend für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 10.
4. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1.
- 10 5. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 3.
6. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend eine Sequenz gemäß
- 15 SEQ ID NO. 5.
7. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 7.
- 20 8. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 9.
9. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend eine Sequenz gemäß
- 25 SEQ ID NO. 11.
10. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus *Cylicocyclus* stammt.
11. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie
- 30 aus *Cyathostomum* stammt.

12. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus *Cylicocyclus nassatus* stammt.
- 5 13. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus *Cyathostomum coronatum* stammt.
14. DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Kodon 200 mindestens einen Basenaustausch enthält, der zur Expression eines Polypeptids mit anthelmintischer Resistenz führt.
- 10 15. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zu DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 ist oder Fragmente davon.
16. RNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zu DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 ist.
- 15 17. Expressionskonstrukt, dadurch gekennzeichnet, daß es DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 sowie eine funktionell damit verknüpfte Sequenz, die die Expression der DNA ermöglicht, umfaßt.
- 20 18. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 umfaßt.
19. Wirtszelle, enthaltend DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, ein  
25 Expressionskonstrukt gemäß Anspruch 17, oder einen Vektor gemäß Anspruch 18.
20. Polypeptid kodiert von einer DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder Fragmente davon.
- 30

21. Polypeptid gemäß Anspruch 20, bestehend aus oder umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2.
22. Polypeptid gemäß Anspruch 20, bestehend aus oder umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 4.
23. Polypeptid gemäß Anspruch 20, bestehend aus oder umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 6.
24. Polypeptid gemäß Anspruch 20, bestehend aus oder umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 8.
25. Polypeptid gemäß Anspruch 20, bestehend aus oder umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 10.
26. Polypeptid kodiert von einer DNA gemäß Anspruch 14.
27. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 20 bis 26, umfassend die Expression des Polypeptids oder Fragmente davon in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionssystem.
28. Verwendung von DNA-Oligonukleotiden, die spezifisch an DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hybridisieren, bevorzugt an nicht kodierende DNA-Abschnitte, zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt.
29. Verwendung von DNA, die spezifisch an DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hybridisiert, zur Detektion von DNA, die aus Cyathostominae stammt und für ein Polypeptid gemäß Anspruch 26 kodiert.

30. Verfahren zur Detektion von Cyathostominae, dadurch gekennzeichnet, daß man DNA gemäß Anspruch 28 an DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hybridisiert und diese mittels PCR amplifiziert.
- 5 31. Verfahren zur Detektion von Cyathostominae mit anthelmintischer Resistenz, dadurch gekennzeichnet, daß man DNA gemäß Anspruch 29 an DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hybridisiert und diese mittels PCR amplifiziert.
- 10 32. DNA-Oligonukleotide umfassend eine der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 12 bis SEQ ID NO. 51 oder eine aus einer der DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 bis 15 abgeleitete Sequenz.
- 15 33. Diagnostischer Testkit umfassend mindestens eines der Oligonukleotide gemäß Anspruch 32 und/oder Antikörper gemäß Anspruch 35 oder 36.
- 20 34. Diagnostischer Testkit gemäß Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Oligonukleotide mit einem detektierbaren Marker versehen sind.
35. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch mit einem Epitop eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 20 bis 26 reagiert.
36. Antikörper gemäß Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
- 25 37. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 35 oder 36 als Nematizide.
38. Verwendung von Polypeptiden gemäß einem der Ansprüche 20 bis 26 zur Herstellung von Vakzinen.
- 30 39. Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die die Interaktion von Tubulin modulieren.

40. Verfahren gemäß Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß man
- 5 a) die Testsubstanz unter solchen Bedingungen mit Tubulin in Kontakt bringt, die eine Interaktion der Tubulinmoleküle miteinander und eine Bindung der Testsubstanz an Tubulin gestatten,
- 10 b) die erfolgte Bindung der Testsubstanz detektiert, indem man die Fähigkeit der Tubulin-Proteinmoleküle zur Interaktion miteinander bestimmt, und
- 15 c) die Fähigkeit der Tubulin-Proteinmoleküle zur Interaktion miteinander bei Anwesenheit der Testsubstanz mit ihrer Fähigkeit zur Interaktion miteinander bei Abwesenheit einer Testsubstanz vergleicht.
41. Verfahren gemäß Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Tubulin ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 26 ist.
- 20 42. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 39 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Detektion einer Modulation der Tubulininteraktion bei Anwesenheit einer Testsubstanz ein auf Zellen basierendes Testsystem verwendet.
- 25 43. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 39 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Detektion einer Modulation der Tubulininteraktion bei Anwesenheit einer Testsubstanz ein zellfreies Testsystem verwendet.
44. Substanzen, die in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 39 bis 43 identifiziert werden.

45. Verwendung einer Substanz gemäß Anspruch 44 zur Herstellung eines Mittels zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Nematodenbefall.

The first part of the report is a general introduction to the project. It describes the purpose of the study and the objectives that were set at the beginning. The second part is a detailed description of the methodology used in the study. This includes information about the data collection methods, the sample size, and the statistical tests that were used to analyze the data.

The third part of the report is a discussion of the results of the study. This section describes the findings of the study and compares them to the results of previous studies. The fourth part is a conclusion that summarizes the main findings of the study and provides some suggestions for future research.

The fifth part of the report is a list of references. This section contains a list of all the sources that were used in the study. The sixth part is an appendix that contains additional information that is not included in the main body of the report.

The seventh part of the report is a list of figures and tables. This section contains a list of all the figures and tables that are included in the report. The eighth part is a list of abbreviations that are used in the report.

The ninth part of the report is a list of keywords that are used in the report. The tenth part is a list of the names of the authors of the report.

The eleventh part of the report is a list of the names of the reviewers of the report. The twelfth part is a list of the names of the members of the committee that approved the report.

The thirteenth part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The fourteenth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The fifteenth part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The sixteenth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The seventeenth part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The eighteenth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The nineteenth part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The twentieth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The twenty-first part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The twenty-second part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The twenty-third part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The twenty-fourth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The twenty-fifth part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The twenty-sixth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The twenty-seventh part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The twenty-eighth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The twenty-ninth part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The thirtieth part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.

The thirty-first part of the report is a list of the names of the members of the committee that recommended the report. The thirty-second part is a list of the names of the members of the committee that recommended the report.



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Bayer AG

5

&lt;120&gt; DNA kodierend für Beta-Tubulin und deren Verwendung

&lt;130&gt; Le A 33 759

10

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 51

15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1380

&lt;212&gt; DNA

20

&lt;213&gt; Cyathostomum coronatum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1344)

25

&lt;400&gt; 1

atg cgt gag atc gtg cat gta caa gct gga caa tgt gga aac caa att 48

Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile

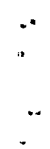
1

5

10

15

30



ggt tcc aag ttt tgg gaa gtg atc tct gac gag cat ggc att aag ccc 96  
 Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile Lys Pro  
 20 25 30

5 gat ggc aca tac cac gga gaa tct gat cta caa tta gaa cga atc aat 144  
 Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu Gln Leu Glu Arg Ile Asn  
 35 40 45

10 gtg tac tat aat gaa gca cat gga ggc aaa tat gtc cca cgt gca gtt 192  
 Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys Tyr Val Pro Arg Ala Val  
 50 55 60

15 ctt gtt gat ctc gag ccc gga act atg gat tcc gtc cgt tcc ggc cca 240  
 Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ser Gly Pro  
 65 70 75 80

20 tac ggg caa ttg ttc cgc cct gat aac tac gtg ttt gga cag tct ggc 288  
 Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr Val Phe Gly Gln Ser Gly  
 85 90 95

25 gca gga aat aac tgg gca aaa ggt cac tac act gaa ggc gct gaa ctt 336  
 Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu  
 100 105 110

30 gtc gac aat gta cta gat gta gtg cga aaa gaa gca gaa gga tgt gac 384  
 Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys Glu Ala Glu Gly Cys Asp  
 115 120 125



tgt ctg cag ggc ttc cag cta act cac tca ctt gga gga ggt acc ggt  
 432  
 Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly  
 5           130                           135                           140

tcg ggt atg ggc act ctc ctc atc tcc aaa att cgg gag gag tat cct  
 480  
 Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro  
 10           145                           150                           155                           160

gat aga atc atg tcc tcg ttc tcc gtt gtc ccc tca cca aag gtc tcc  
 528  
 Asp Arg Ile Met Ser Ser Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser  
 15                           165                           170                           175

gac act gtt gtg gag cct tac aat gct acc cta tcc gtt cat cag ttg  
 576  
 Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu  
 20                           180                           185                           190

gtt gaa aat aca gac gag act tat tgt att gac aat gaa gcc ctg tat  
 624  
 Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr  
 25                           195                           200                           205

gat att tgc ttc cgc act ttg aaa ctc acg aac cca act tat gga gat  
 672  
 Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr Asn Pro Thr Tyr Gly Asp  
 30           210                           215                           220

ctg aat cat ctt gtg tct gta aca atg tct ggt gtc acc aca tgt ctt  
 720



1

2

3

4

5

6

7

8

Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser Gly Val Thr Thr Cys Leu  
225 230 235 240

5 cgc ttc cct ggc caa ttg aat gcc gat cta cgc aaa cta gct gtt aac  
768

Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn  
245 250 255

10 atg gtt cca ttc cct cgt ctt cac ttc ttc atg cct ggt ttt gct cct  
816

Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe Met Pro Gly Phe Ala Pro  
260 265 270

15 ctt tct gct aaa ggt gct cag gct tac cgt gct ctt acc gta gcc gag  
864

Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Val Ala Glu  
275 280 285

20 ctt aca cag cag atg ttt gat gct aag aat atg atg gct gct tgc gac  
912

Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn Met Met Ala Ala Cys Asp  
290 295 300

25 cct cga cat gga cgt tat ctc acc gtc gca gcc atg ttc cga gga aga  
960

Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala Ala Met Phe Arg Gly Arg  
305 310 315 320

30 atg agc atg agg gaa gta gac gac cag atg atg tca gtg cag aac aag  
1008

Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met Met Ser Val Gln Asn Lys  
325 330 335



1

2

3

4

5

6

7

8



aac tcc tca tac ttc gta gag tgg atc ccg aac aac gtg aag acc gct  
1056

Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Thr Ala  
340 345 350

5

gta tgc gac atc ccg cca cga gga ctg aag atg gcc gct acc ttc gtt  
1104

Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys Met Ala Ala Thr Phe Val  
355 360 365

10

gga aac tca act gcc atc caa gag ctg ttc aag cgc att tca gaa caa  
1152

Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe Lys Arg Ile Ser Glu Gln  
370 375 380

15

ttt aca gcc atg ttc cgc cgc aaa gcg ttc ttg cat tgg tac act ggt  
1200

Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly  
385 390 395 400

20

gaa ggt atg gac gag atg gag ttc act gaa gca gag tcc aac atg aat  
1248

Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn  
405 410 415

25

gat ctc atc tcc gag tac caa cag tac cag gaa gcc acc gct gac gac  
1296

Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Glu Ala Thr Ala Asp Asp  
420 425 430

30

atg ggc gat ctt gat gcg gaa ggc gct gaa gag gct tat cct gag gaa  
1344

Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu Glu Ala Tyr Pro Glu Glu



1

2

3

4

5

6

7

8

9

- 6 -

435

440

445

taaaccagca gatcgtgttg cgttgttcgt ttctct  
1380

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

10

&lt;213&gt; Cyathostomum coronatum

&lt;400&gt; 2

Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile

1

5

10

15

15

Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile Lys Pro

20

25

30

Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu Gln Leu Glu Arg Ile Asn

20

35

40

45

Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys Tyr Val Pro Arg Ala Val

50

55

60

25

Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ser Gly Pro

65

70

75

80

Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr Val Phe Gly Gln Ser Gly

85

90

95

30



1

2

3

4

5

6

7

8

9

Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu  
100 105 110

Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys Glu Ala Glu Gly Cys Asp  
5 115 120 125

Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly  
130 135 140

Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro  
10 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Ser Ser Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser  
165 170 175

Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu  
15 180 185 190

Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr  
20 195 200 205

Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr Asn Pro Thr Tyr Gly Asp  
210 215 220

Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser Gly Val Thr Thr Cys Leu  
25 225 230 235 240

Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn  
245 250 255



1

2

3

4

5

6

7

8

Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe Met Pro Gly Phe Ala Pro  
260 265 270

5 Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Val Ala Glu  
275 280 285

Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn Met Met Ala Ala Cys Asp  
290 295 300

10 Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala Ala Met Phe Arg Gly Arg  
305 310 315 320

Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met Met Ser Val Gln Asn Lys  
325 330 335

15 Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Thr Ala  
340 345 350

Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys Met Ala Ala Thr Phe Val  
20 355 360 365

Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe Lys Arg Ile Ser Glu Gln  
370 375 380

25 Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly  
385 390 395 400

Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn  
405 410 415

30



1  
2  
3  
4

5  
6  
7  
8



- 9 -

Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Glu Ala Thr Ala Asp Asp

420

425

430

Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu Glu Ala Tyr Pro Glu Glu

5

435

440

445

&lt;210&gt; 3

10

&lt;211&gt; 1429

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Cylicocyclus nassatus

&lt;220&gt;

15

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1362)

&lt;400&gt; 3

20

aag ttc tct act gca ata atg cgt gag atc gtg cat gta caa gct gga 48

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

car tgt gga aac caa att ggy tcc aag tty tgg gaa gtg atc tct gac 96

Gln Cys Gly Asn Gln Ile Xaa Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

25

20

25

30

gag cac ggc att aag ccy gay ggc aca tac cay gga gaa tct gay yta  
144

Glu His Gly Ile Lys Xaa Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Xaa

30

35

40

45



1

2

3

4

5

6

7

8

caa tta gaa cga atc aat gtg tac tat aat gaa gca cat gga ggc aar  
192

Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys

5                    50                    55                    60

tat gtc ccg cgt gca gtt ctt gtt gat ctc gag ccc gga act atg gat  
240

Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp

10                    65                    70                    75                    80

tcr gtc cgy tcy ggg cca tac ggg caa ttg ttc cgc cct gat aac tac  
288

Xaa Val Xaa Xaa Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr

15                    85                    90                    95

gtg ttt gga cag tct ggc gca gga aat aac tgg gca aaa ggt cac tac  
336

Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr

20                    100                    105                    110

act gaa ggy gct gaa ctt gtc gac aat gta cta gat gta gtg cga aaa  
384

Thr Glu Xaa Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys

25                    115                    120                    125

gaa gct gaa gga tgt gac tgt ctg cag ggc ttc cag cta act cac tca  
432

Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser

30                    130                    135                    140

ctt gga gga ggt acc gga tcg rgt atg ggc acw ctc ctc atc tyc aaa  
480



1

2

3

4

5

6

7

8

Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Xaa Met Gly Xaa Leu Leu Ile Xaa Lys  
145 150 155 160

5 att cgg gag gag tat cct gat aga atc atr tcc tcg ttc tyc gtt gtt  
528  
Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Xaa Ser Ser Phe Xaa Val Val  
165 170 175

10 ccc tca cca aag gtc tyc gay acy gtt gtg gag ccg tac aat gct acc  
576  
Pro Ser Pro Lys Val Xaa Asp Xaa Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr  
180 185 190

15 cta tcc gtt cat cag ttg gtt gaa aat aca gac gar act twc tgt att  
624  
Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Xaa Cys Ile  
195 200 205

20 gac aat gaa gct ctt tat gat att tgc ttc cgc acy ytg aaa ctc acs  
672  
Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Xaa Xaa Lys Leu Xaa  
210 215 220

25 aac cca act tat gga gat ctg aat cat ctt gtg tct gta aca atg tct  
720  
Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser  
225 230 235 240

30 ggy gtc act aca tgy ctt cgc ttc cct ggc caa ttg rry gcc gat ctw  
768  
Xaa Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Xaa Ala Asp Xaa  
245 250 255



1

2

3

4

5  
6  
7  
8

- 12 -

cgt aaa cta gct gtt aac atg gyt cca ttc cct cgt ctt cac tty tty  
816

Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Xaa Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe

260

265

270

5

atg cct ggc ttt gct ccc ctc tct gcy aaa ggc gcy cag gct tac cgt  
864

Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Xaa Lys Gly Xaa Gln Ala Tyr Arg

275

280

285

10

gct ctt act gta gcc gag ctw acy caa yag atg ttc gat gcc aaa aat  
912

Ala Leu Thr Val Ala Glu Xaa Xaa Gln Xaa Met Phe Asp Ala Lys Asn

290

295

300

15

atg atg gcc gct tgc gac cct cga cat gga crt tat ctc acc gty gca  
960

Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Xaa Tyr Leu Thr Xaa Ala

305

310

315

320

20

gcc atg ttc cga gga cga atg agc ayg agg gar gta gac gac cag atg  
1008

Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Xaa Arg Glu Val Asp Asp Gln Met

325

330

335

25

atg tca gtg cag aac aag aac tcc tca tac ttc gta gag tgg att ccg  
1056

Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro

340

345

350

30

aac aac gtc aar acc gcy gta tgc gac att ccg ccr aga gga ctg aaa  
1104

Asn Asn Val Lys Thr Xaa Val Cys Asp Ile Pro Xaa Arg Gly Leu Lys



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11



- 13 -

	355	360	365
	atg gcc gct acc ttc gtt gga aac yca act gcc aty caa gag ctg tty 1152		
5	Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Xaa Thr Ala Xaa Gln Glu Leu Phe		
	370	375	380
	aag cgc att tca gaa caa tty aca gct atg ttc cgc cgc aaa gcg tty 1200		
10	Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe		
	385	390	395 400
	ttg cat ygg tay act ggw gaa ggt atg gay gag atg gag ttc act gaa 1248		
15	Leu His Xaa Tyr Thr Xaa Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu		
	405	410	415
	gcc gag tcc aac atg aat gat ctc atc tcc gaa tac car caa tac cag 1296		
20	Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln		
	420	425	430
	gaa gct acm gct gac gat atg ggc gat ctc gat gcg gaa ggc gct gaa 1344		
25	Glu Ala Xaa Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu		
	435	440	445
	gag gct tac cct gar gaa tagamcagca gaytgtgttg cggtgttcgt 1392		
30	Glu Ala Tyr Pro Glu Glu		
	450		



1

2

3

4

5

6

7

8

9

- 14 -

ttctcrtgt caatgcgaaa tacacattga ttgcgtt  
1429

5 <210> 4

<211> 454

<212> PRT

<213> Cylicocyclus nassatus

10 <400> 4

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

Gln Cys Gly Asn Gln Ile Xaa Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

15

20

25

30

Glu His Gly Ile Lys Xaa Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Xaa

35

40

45

20

Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys

50

55

60

Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp

65

70

75

80

25

Xaa Val Xaa Xaa Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr

85

90

95

Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr

30

100

105

110



1  
2  
3  
4

1  
2  
3  
4

- 15 -

Thr Glu Xaa Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys  
115 120 125

5 Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser  
130 135 140

Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Xaa Met Gly Xaa Leu Leu Ile Xaa Lys  
145 150 155 160

10 Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Xaa Ser Ser Phe Xaa Val Val  
165 170 175

Pro Ser Pro Lys Val Xaa Asp Xaa Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr  
15 180 185 190

Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Xaa Cys Ile  
195 200 205

20 Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Xaa Xaa Lys Leu Xaa  
210 215 220

Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser  
225 230 235 240

25 Xaa Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Xaa Ala Asp Xaa  
245 250 255

Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Xaa Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe  
30 260 265 270

11  
12  
13  
14  
15

16  
17  
18  
19  
20

- 16 -

Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Xaa Lys Gly Xaa Gln Ala Tyr Arg  
275 280 285

5 Ala Leu Thr Val Ala Glu Xaa Xaa Gln Xaa Met Phe Asp Ala Lys Asn  
290 295 300

Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Xaa Tyr Leu Thr Xaa Ala  
305 310 315 320

10 Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Xaa Arg Glu Val Asp Asp Gln Met  
325 330 335

Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro  
15 340 345 350

Asn Asn Val Lys Thr Xaa Val Cys Asp Ile Pro Xaa Arg Gly Leu Lys  
355 360 365

20 Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Xaa Thr Ala Xaa Gln Glu Leu Phe  
370 375 380

Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe  
385 390 395 400

25 Leu His Xaa Tyr Thr Xaa Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu  
405 410 415

Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln  
30 420 425 430

か  
り  
り

り  
り  
り



Glu Ala Xaa Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu

435

440

445

5 Glu Ala Tyr Pro Glu Glu

450

10 <210> 5

&lt;211&gt; 1428

&lt;212&gt; DNA

<213> *Cylicocyclus nassatus*

15 <220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1362)

&lt;400&gt; 5

20 aag ttc tct act gca ata atg cgt gag atc gtg cat gta caa gct gga 48

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

cag tgt gga aac caa att ggc tcc aag ttt tgg gaa gtg atc tct gac 96

25 Gln Cys Gly Asn Gln Ile Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

20

25

30

gag cac ggc att aag cct gat ggc aca tac cac gga gaa tct gat tta  
144

30 Glu His Gly Ile Lys Pro Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu



- 18 -

	35	40	45
	caa tta gaa cga atc aat gtg tac tat aat gaa gca cat gga ggc aaa 192		
5	Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys		
	50	55	60
	tat gtc ccg cgt gca gtt ctt gtt gat ctc gag ccc gga act atg gat 240		
10	Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp		
	65	70	75 80
	tcg gtc cgt tcc ggg cca tac ggg caa ttg ttc cgc cct gat aac tac 288		
15	Ser Val Arg Ser Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr		
	85	90	95
	gtg ttt gga cag tct ggc gca gga aat aac tgg gca aaa ggt cac tac 336		
20	Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr		
	100	105	110
	act gaa ggc gct gaa ctt gtt gac aat gta cta gat gta gtg cga aaa 384		
25	Thr Glu Gly Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys		
	115	120	125
	gaa gct gaa gga tgt gac tgt ctg cag ggc ttc cag cta act cac tca 432		
30	Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser		
	130	135	140



ctt gga gga ggt acc gga tcg ggt atg ggc act ctc ctc atc tcc aaa  
480

Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys

145 150 155 160

5

att cgg gag gag tat cct gat aga atc atg tcc tcg ttc tcc gtt gtt  
528

Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Ser Ser Phe Ser Val Val

165 170 175

10

ccc tca cca aag gtc tcc gac acc gtt gtg gag ccg tac aat gct acc  
576

Pro Ser Pro Lys Val Ser Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr

180 185 190

15

cta tcc gtt cat cag ttg gtt gaa aat aca gac gag act ttc tgt att  
624

Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Phe Cys Ile

195 200 205

20

gac aat gaa gct ctt tat gat att tgc ttc cgc act ttg aaa ctc acg  
672

Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr

210 215 220

25

aac cca act tat gga gat ctg aat cat ctt gtg tct gta aca atg tct  
720

Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser

225 230 235 240

30

ggc gtc act aca tgt ctt cgc ttc cct ggc caa ttg aat gcc gat cta  
768

Gly Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu



- 20 -

	245	250	255
	cgt aaa cta gct gtt aac atg gtt cca ttc cct cgt ctt cac ttc ttt		
	816		
5	Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe		
	260	265	270
	atg cct ggc ttt gct ccc ctc tct gct aaa ggc gct cag gct tac cgt		
	864		
10	Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg		
	275	280	285
	gct ctt act gta gcc gag cta act caa cag atg ttc gat gcc aaa aat		
	912		
15	Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn		
	290	295	300
	atg atg gcc gct tgc gac cct cga cat gga cgt tat ctc acc gtc gca		
	960		
20	Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala		
	305	310	315 320
	gcc atg ttc cga gga cga atg agc atg agg gag gta gac gac cag atg		
	1008		
25	Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met		
	325	330	335
	atg tca gtg cag aac aag aac tcc tca tac ttc gta gag tgg att ccg		
	1056		
30	Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro		
	340	345	350



2

3

4

5

6

100

1

2

3

4

5



aac aac gtc aag acc gct gta tgc gac att ccg ccg aga gga ctg aaa  
1104

Asn Asn Val Lys Thr Ala Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys

355

360

365

5

atg gcc gct acc ttc gtt gga aac tca act gcc atc caa gag ctg ttc  
1152

Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe

370

375

380

10

aag cgc att tca gaa caa ttc aca gct atg ttc cgc cgc aaa gcg ttc  
1200

Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe

385

390

395

400

15

ttg cat tgg tat act ggt gaa ggt atg gac gag atg gag ttc act gaa  
1248

Leu His Trp Tyr Thr Gly Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu

405

410

415

20

gcc gag tcc aac atg aat gat ctc atc tcc gaa tac cag caa tac cag  
1296

Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln

420

425

430

25

gaa gct aca gct gac gat atg ggc gat ctc gat gcg gaa ggc gct gaa  
1344

Glu Ala Thr Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu

435

440

445

30

gag gct tac cct gaa gaa tagacagcag attgtgttgc gttgttcgtt  
1392

Glu Ala Tyr Pro Glu Glu



450

tctctgtgtc aatgcgaaat acacattgat tgcggt  
1428

5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 454

&lt;212&gt; PRT

10

&lt;213&gt; Cylicocyclus nassatus

&lt;400&gt; 6

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

15

Gln Cys Gly Asn Gln Ile Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

20

25

30

20

Glu His Gly Ile Lys Pro Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu

35

40

45

Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys

50

55

60

25

Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp

65

70

75

80

Ser Val Arg Ser Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr

85

90

95

30



- 23 -

Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr  
100 105 110

Thr Glu Gly Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys  
5 115 120 125

Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser  
130 135 140

Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys  
10 145 150 155 160

Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Ser Ser Phe Ser Val Val  
15 165 170 175

Pro Ser Pro Lys Val Ser Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr  
180 185 190

Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Phe Cys Ile  
20 195 200 205

Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr  
210 215 220

Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser  
25 225 230 235 240

Gly Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu  
245 250 255

30



1

•

•

1

1

**T**

- 24 -

Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe  
260 265 270

5 Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg  
275 280 285

Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn  
290 295 300

10 Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala  
305 310 315 320

Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met  
325 330 335

15 Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro  
340 345 350

Asn Asn Val Lys Thr Ala Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys  
20 355 360 365

Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe  
370 375 380

25 Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe  
385 390 395 400

Leu His Trp Tyr Thr Gly Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu  
405 410 415

30



1

2

3

4

5

6

7



- 25 -

Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln

420

425

430

Glu Ala Thr Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu

5

435

440

445

Glu Ala Tyr Pro Glu Glu

450

10

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1429

&lt;212&gt; DNA

15

&lt;213&gt; Cylicocyclus nassatus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1362)

20

&lt;400&gt; 7

aag ttc tct act gca ata atg cgt gag atc gtg cat gta caa gct gga 48

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

25

cag tgt gga aac caa att ggt tcc aag ttt tgg gaa gtg atc tct gac 96

Gln Cys Gly Asn Gln Ile Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

20

25

30



gag cac ggc att aag ccc gat ggc aca tac cac gga gaa tct gac tta  
144

Glu His Gly Ile Lys Pro Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu  
35 40 45

5

caa tta gaa cga atc aat gtg tac tat aat gaa gca cat gga ggc aaa  
192

Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys  
50 55 60

10

tat gtc ccg cgt gca gtt ctt gtt gat ctc gag ccc gga act atg gat  
240

Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp  
65 70 75 80

15

tcg gtc cgt tcc ggg cca tac ggg caa ttg ttc cgc cct gat aac tac  
288

Ser Val Arg Ser Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr  
85 90 95

20

gtg ttt gga cag tct ggc gca gga aat aac tgg gca aaa ggt cac tac  
336

Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr  
100 105 110

25

act gaa ggc gct gaa ctt gtc gac aat gta cta gat gta gtg cga aaa  
384

Thr Glu Gly Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys  
115 120 125

30

gaa gct gaa gga tgt gac tgt ctg cag ggc ttc cag cta act cac tca  
432

Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser



1

2

3

4

5

6

7

130 135 140

ctt gga gga ggt acc gga tcg agt atg ggc act ctc ctc atc ttc aaa  
480

5 Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Met Gly Thr Leu Leu Ile Phe Lys  
145 150 155 160

att cgg gag gag tat cct gat aga atc ata tcc tcg ttc ttc gtt gtt  
528

10 Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Ile Ser Ser Phe Phe Val Val  
165 170 175

ccc tca cca aag gtc tcc gac acc gtt gtg gag ccg tac aat gct acc  
576

15 Pro Ser Pro Lys Val Ser Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr  
180 185 190

cta tcc gtt cat cag ttg gtt gaa aat aca gac gag act ttc tgt att  
624

20 Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Phe Cys Ile  
195 200 205

gac aat gaa gct ctt tat gat att tgc ttc cgc act ttg aaa ctc acg  
672

25 Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr  
210 215 220

aac cca act tat gga gat ctg aat cat ctt gtg tct gta aca atg tct  
720

30 Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser  
225 230 235 240



ggt gtc act aca tgt ctt cgc ttc cct ggc caa ttg agt gcc gat cta  
768  
Gly Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Ser Ala Asp Leu  
245 250 255

5  
cgt aaa cta gct gtt aac atg gtt cca ttc cct cgt ctt cac ttc ttt  
816  
Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe  
260 265 270

10  
atg cct ggc ttt gct ccc ctc tct gct aaa ggc gct cag gct tac cgt  
864  
Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg  
275 280 285

15  
gct ctt act gta gcc gag cta act caa cag atg ttc gat gcc aaa aat  
912  
Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn  
290 295 300

20  
atg atg gcc gct tgc gac cct cga cat gga cgt tat ctc acc gtc gca  
960  
Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala  
305 310 315 320

25  
gcc atg ttc cga gga cga atg agc atg agg gag gta gac gac cag atg  
1008  
Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met  
325 330 335

30  
atg tca gtg cag aac aag aac tcc tca tac ttc gta gag tgg att ccg  
1056  
Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro



100



- 29 -

	340	345	350
	aac aac gtc aag acc gct gta tgc gac att ccg ccg aga gga ctg aaa 1104		
5	Asn Asn Val Lys Thr Ala Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys		
	355	360	365
	atg gcc gct acc ttc gtt gga aac tca act gcc att caa gag ctg ttc 1152		
10	Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe		
	370	375	380
	aag cgc att tca gaa caa ttt aca gct atg ttc cgc cgc aaa gcg ttc 1200		
15	Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe		
	385	390	395 400
	ttg cat tgg tat act ggt gaa ggt atg gac gag atg gag ttc act gaa 1248		
20	Leu His Trp Tyr Thr Gly Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu		
	405	410	415
	gcc gag tcc aac atg aat gat ctc atc tcc gaa tac caa caa tac cag 1296		
25	Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln		
	420	425	430
	gaa gct acc gct gac gat atg ggc gat ctc gat gcg gaa ggc gct gaa 1344		
30	Glu Ala Thr Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu		
	435	440	445



gag gct tac cct gag gaa tagaacagca gattgtgttg cgttggtcgt  
1392

Glu Ala Tyr Pro Glu Glu

450

5

ttctctgtgt caatgcgaaa tacacattga ttgcgtt  
1429

10

<210> 8

<211> 454

<212> PRT

<213> Cylicocyclus nassatus

15

<400> 8

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

Gln Cys Gly Asn Gln Ile Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

20

20

25

30

Glu His Gly Ile Lys Pro Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu

35

40

45

25

Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys

50

55

60

Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp

65

70

75

80

30

Ser Val Arg Ser Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr



85

90

95

Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr

100

105

110

5

Thr Glu Gly Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys

115

120

125

Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser

10

130

135

140

Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ser Met Gly Thr Leu Leu Ile Phe Lys

145

150

155

160

15

Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Ile Ser Ser Phe Phe Val Val

165

170

175

Pro Ser Pro Lys Val Ser Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr

180

185

190

20

Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Phe Cys Ile

195

200

205

Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr

25

210

215

220

Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser

225

230

235

240

30

Gly Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Ser Ala Asp Leu



1

2

3

4

5

6

7

	245	250	255
	Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe		
	260	265	270
5	Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg		
	275	280	285
	Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn		
10	290	295	300
	Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala		
	305	310	315 320
15	Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met		
	325	330	335
	Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro		
	340	345	350
20	Asn Asn Val Lys Thr Ala Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys		
	355	360	365
	Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe		
25	370	375	380
	Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe		
	385	390	395 400
30	Leu His Trp Tyr Thr Gly Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu		





- 33 -

405

410

415

Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln

420

425

430

5

Glu Ala Thr Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu

435

440

445

Glu Ala Tyr Pro Glu Glu

10

450

&lt;210&gt; 9

15

&lt;211&gt; 1428

&lt;212&gt; DNA

<213> *Cylicocyclus nassatus*

&lt;220&gt;

20

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1362)

&lt;400&gt; 9

25

aag ttc tct act gca ata atg cgt gag atc gtg cat gta caa gct gga 48

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

cag tgt gga aac caa att ggt tcc aag ttc tgg gaa gtg atc tct gac 96

Gln Cys Gly Asn Gln Ile Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

30

20

25

30



100

gag cac ggc att aag ccc gac ggc aca tac cat gga gaa tct gat cta  
144

Glu His Gly Ile Lys Pro Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu

5

35

40

45

caa tta gaa cga atc aat gtg tac tat aat gaa gca cat gga ggc aag  
192

Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys

10

50

55

60

tat gtc ccg cgt gca gtt ctt gtt gat ctc gag ccc gga act atg gat  
240

Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp

15

65

70

75

80

tca gtc cgt tct ggg cca tac ggg caa ttg ttc cgc cct gat aac tac  
288

Ser Val Arg Ser Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr

20

85

90

95

gtg ttt gga cag tct ggc gca gga aat aac tgg gca aaa ggt cac tac  
336

Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr

25

100

105

110

act gaa ggc gct gaa ctt gtc gac aat gta cta gat gta gtg cga aaa  
384

Thr Glu Gly Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys

30

115

120

125

gaa gct gaa gga tgt gac tgt ctg cag ggc ttc cag cta act cac tca  
432



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser  
 130 135 140

5 ctt gga gga ggt acc gga tcg ggt atg ggc aca ctc ctc atc tcc aaa  
 480  
 Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys  
 145 150 155 160

10 att cgg gag gag tat cct gat aga atc atg tcc tcg ttc tcc gtt gtt  
 528  
 Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Ser Ser Phe Ser Val Val  
 165 170 175

15 ccc tca cca aag gtc ttc gat act gtt gtg gag ccg tac aat gct acc  
 576  
 Pro Ser Pro Lys Val Phe Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr  
 180 185 190

20 cta tcc gtt cat cag ttg gtt gaa aat aca gac gag act ttc tgt att  
 624  
 Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Phe Cys Ile  
 195 200 205

25 gac aat gaa gct ctt tat gat att tgc ttc cgc acc ttg aaa ctc acg  
 672  
 Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr  
 210 215 220

30 aac cca act tat gga gat ctg aat cat ctt gtg tct gta aca atg tct  
 720  
 Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser  
 225 230 235 240



ggt gtc act aca tgc ctt cgc ttc cct ggc caa ttg aat gcc gat cta  
768  
Gly Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu  
245 250 255

5  
cgt aaa cta gct gtt aac atg gtt cca ttc cct cgt ctt cac ttc ttc  
816  
Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe  
260 265 270

10  
atg cct ggc ttt gct ccc ctc tct gcc aaa ggc gcc cag gct tac cgt  
864  
Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg  
275 280 285

15  
gct ctt act gta gcc gag cta act caa cag atg ttc gat gcc aaa aat  
912  
Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn  
290 295 300

20  
atg atg gcc gct tgc gac cct cga cat gga cgt tat ctc acc gtc gca  
960  
Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala  
305 310 315 320

25  
gcc atg ttc cga gga cga atg agc atg agg gag gta gac gac cag atg  
1008  
Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met  
325 330 335

30  
atg tca gtg cag aac aag aac tcc tca tac ttc gta gag tgg att ccg  
1056  
Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro



100



- 37 -

340

345

350

aac aac gtc aaa acc gct gta tgc gac att ccg ccg aga gga ctg aaa  
1104

5 Asn Asn Val Lys Thr Ala Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys

355

360

365

atg gcc gct acc ttc gtt gga aac tca act gcc att caa gag ctg ttc  
1152

10 Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe

370

375

380

aag cgc att tca gaa caa ttc aca gct atg ttc cgc cgc aaa gcg ttc  
1200

15 Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe

385

390

395

400

ttg cat tgg tat act ggt gaa ggt atg gac gag atg gag ttc act gaa  
1248

20 Leu His Trp Tyr Thr Gly Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu

405

410

415

gcc gag tcc aac atg aat gat ctc atc tcc gaa tac cag caa tac cag  
1296

25 Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln

420

425

430

gaa gct acc gct gac gat atg ggc gat ctc gat gcg gaa ggc gct gaa  
1344

30 Glu Ala Thr Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu

435

440

445



1

2

3

4

5

6

gag gct tac cct gaa gaa tagacagcag attgtgttgc gttgttcgtt  
1392

Glu Ala Tyr Pro Glu Glu

450

5

tctctgtgtc aatgcgaaat acacattgat tgcgtt  
1428

10

<210> 10

<211> 454

<212> PRT

<213> *Cylicocyclus nassatus*

15

<400> 10

Lys Phe Ser Thr Ala Ile Met Arg Glu Ile Val His Val Gln Ala Gly

1

5

10

15

Gln Cys Gly Asn Gln Ile Gly Ser Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp

20

20

25

30

Glu His Gly Ile Lys Pro Asp Gly Thr Tyr His Gly Glu Ser Asp Leu

35

40

45

25

Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala His Gly Gly Lys

50

55

60

Tyr Val Pro Arg Ala Val Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp

65

70

75

80

30

Ser Val Arg Ser Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Tyr



85

90

95

Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr

100

105

110

5

Thr Glu Gly Ala Glu Leu Val Asp Asn Val Leu Asp Val Val Arg Lys

115

120

125

Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser

10

130

135

140

Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys

145

150

155

160

15

Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Ser Ser Phe Ser Val Val

165

170

175

Pro Ser Pro Lys Val Phe Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr

180

185

190

20

Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Phe Cys Ile

195

200

205

Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr

25

210

215

220

Asn Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Val Thr Met Ser

225

230

235

240

30

Gly Val Thr Thr Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu



- 40 -

	245	250	255
	Arg Lys Leu Ala Val Asn Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe		
	260	265	270
5	Met Pro Gly Phe Ala Pro Leu Ser Ala Lys Gly Ala Gln Ala Tyr Arg		
	275	280	285
	Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn		
10	290	295	300
	Met Met Ala Ala Cys Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala		
	305	310	315 320
15	Ala Met Phe Arg Gly Arg Met Ser Met Arg Glu Val Asp Asp Gln Met		
	325	330	335
	Met Ser Val Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro		
	340	345	350
20	Asn Asn Val Lys Thr Ala Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys		
	355	360	365
	Met Ala Ala Thr Phe Val Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe		
25	370	375	380
	Lys Arg Ile Ser Glu Gln Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe		
	385	390	395 400
30	Leu His Trp Tyr Thr Gly Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu		



1

2

3

4

100

5

6

100



- 41 -

405

410

415

Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Ile Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln

420

425

430

5

Glu Ala Thr Ala Asp Asp Met Gly Asp Leu Asp Ala Glu Gly Ala Glu

435

440

445

Glu Ala Tyr Pro Glu Glu

10

450

&lt;210&gt; 11

15

&lt;211&gt; 2655

&lt;212&gt; DNA

<213> *Cylicocyclus nassatus*

&lt;220&gt;

20

&lt;221&gt; intron

&lt;222&gt; (1) .. (18)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; intron

25

&lt;222&gt; (1) .. (18)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; intron

&lt;222&gt; (76) .. (358)

30



<220>

<221> intron

<222> (469) .. (637)

5

<220>

<221> intron

<222> (865) .. (1374)

<220>

10

<221> intron

<222> (1666) .. (1723)

<220>

<221> intron

15

<222> (1915) .. (1966)

<220>

<221> intron

<222> (2064) .. (2119)

20

<220>

<221> intron

<222> (2306) .. (2354)

25

<220>

<221> intron

<222> (2475) .. (2523)

<220>

30

<221> intron



1

2

3

4

5

6

<222> (2592) .. (2655)

<400> 11

aagttctcta ctgcaataat gcgtgagatc gtgcatgtac aagctggaca rtgtggaaac 60  
5 caaattgggt ccaaggtrcg gtagtttyrr twktytrytg atcgtaattc sggmgytytr  
120  
dagtrryttt ttycgytgyy ratgttgcac yrtgttgca taaascytaa aawtcawwag  
180  
10 rcgaggctgt aaaagsactt ytacttttra atmcrvtgta gcagcatgag tcatcrgcat  
240  
gtttgcagtg sgttttttat gcgcwgawcc ytcagaaga tgagaatgag wtccaytgag  
300  
cwtagartct grctttctct cgttawctaa ratcaamtta carcrytyca ttttkcagtt  
360  
15 ytgggaagtg atctctgacg agcacggcat taagccygay ggcacatacc ayggagaatc  
420  
tgatytacaa ttagaacgaa tcaatgtgta ctataatgaa gcacatgggt agtcgtayac  
480  
20 ccgcttcggt gtytccmat gcagrcyct tcagttttta taactgyca aatctgac  
540  
gggctctttt gcagcggccw ygattacgca ataccayyg gcgygcagtg gcrgtcgaaa  
600  
ttaatgtggt caracgtgaa aatgtggtgc tttyaggagg caartatgtc ccgctgcag  
660  
25 ttcttggtga tctcgagccc ggaactatgg attcgggtccg ytccgggcca tacgggcaat  
720  
tgttccgccc tgataactac gtgtttggac agtctggcgc aggaaataac tgggcaaaag  
780  
30 gtcactacac tgaaggygct gaacttgctg acaatgtact agatgtagt cgaaaagaag  
840  
ctgaaggatg tgactgtctg caggtaaatt tccaagtagt agcaggaaat ggtwtgtgra  
900  
tagcataaca aaagtcatag aaggaatatg gacgctagtc aaaacaaagw tggacgttar  
960  
35 tcggctcgtcc gggacarttt ggaagtcag ggtcasccaa cacgcttttt tamaagtaca  
1020  
tcatactctt ttcccacgaa aagctatttt gcgtattacg gggtagagg gaggggtcaa  
1080



aatcacagat tgctgaaaty tggttcactg ragttattgr tgaaaatcat attgattttg  
1140

cttgctactg ccttccttttr aggctatgct ttacaatctt ggggectgga taaccgaatt  
1200

5 gtcygaagtt tttcggatcat cacggacggg gaaggggcat artatcgta kttcttgkta  
1260

tttcgcagca tatggcaatc tytccacttc tgacaagttt tcygtagaaa atatwcttca  
1320

10 aggtstcaag aacyttgctg ctagrgrctgt aaaccaayct gtatcycttt cagggttcc  
1380

agctaactca ctcacttgga ggaggatccg gatcgggtat gggcactctc ctcactcca  
1440

aaattcggga ggagtatct gatagaatca tgcctcgtt ctccgttgtt cctcaccaa  
1500

15 aggtctccga caccgttggt gagccgtaca atgctaccct atccgttcat cagttgggtg  
1560

aaaatacaga cgaracttwc tgtattgaca atgaagctct ttatgatatt tgcttccgca  
1620

20 cyytgaaact cacsaaacca acttatggag atctgaatca tcttggttrg yrayatkcsa  
1680

ytgctgagct tdgtrgaatt tvctaattwt ktyhamtdty yagtgtctgt aacaatgtct  
1740

ggygtcacta catgycttcg ctccctggc caattgrayg ccgatctwcg taaactagct  
1800

25 gttaacatgg ytccattccc tcgtcttcac ttttyatgc ctggctttgc tcccctctct  
1860

gcyyaaggcg cycaggctta ccgtgctctt actgtagccg agctwacyca rcagggtcgt  
1920

30 ctgcttater ttgwtgayrt gtgtttattc kttgtrtatt ttayagatgt tcgatgcaa  
1980

aaatatgatg gccgcttgcg accctcgaca tggacratt ctcaccgttg cagccatgtt  
2040

ccgaggacga atgagcayga gggtaagtgg mtkmttggyt ytytaryaya rctcrgacga  
2100

35 awtgtgtgta tgcmtagga rgtagacgac cagatgatgt cagtgcagaa caagaactcc  
2160

tcatacttcg tagagtggat tccgaacaac gtcaaraccg cygtatgca cattccgccc  
2220

40 agaggactga aaatggccgc taccttcgtt ggaaacycaa ctgccatcca agagctgtty  
2280



1

2

3

4

5

6

7



aagcgcattt cagaacaatt yacaggttdg tttgtgcaya ttatgggtgaa agcagattar  
2340

ttgcgaygtt gcagctatgt tccgccgcaa agcgattyttg catygggtaya ctggwgaagg  
2400

5 tatggaygag atggagttca ctgaagccga gtccaacatg aatgatctca tctccgaata  
2460

ccarcaatac caggttcggc tgtytttcwt rgayactgtr ttttaataatt wtttyttgtct  
2520

10 aggaagctac cgctgacgat atgggcgatc tcgatgcgga aggcgctgaa gaggcttacc  
2580

ctgargaata gamcagcaga ytgtggttgcg ttgttcgttt ctctrtgtca atgcgaaata  
2640

cacattgatt gcgtt  
2655

15

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Hybridisierungssonde/Primer

25

<400> 12

ggtttaatta tcccaagttt gag

23

30

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz



10

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

5

<400> 13

ggccacgcgt cgactagtac

20

10

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

15

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 14

20

ggccacgcgt cgactagtac tttttttttt ttttttt

37

<210> 15

<211> 22

25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

30

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden



<400> 15

gaccgctgta tgcgacattc cg

22

5

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

15

<400> 16

aactcaactg ccatccaaga gc

22

20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

25

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

30

<400> 17

gctatgttcc gccgcaaagc g

21



- <210> 18  
<211> 25  
<212> DNA  
5 <213> Künstliche Sequenz
- <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden  
10
- <400> 18  
acgagcacgg cattaagcct gatgg 25
- 15 <210> 19  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz
- 20 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden
- <400> 19  
25 ccatcaggct taatgccgtg ctcgt 25
- <210> 20  
<211> 25  
30 <212> DNA





<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

5            Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 20

ccgaatccat agttccgggc tcgag

25

10

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

15

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

20

<400> 21

ccgacaccgt tgtggagccg taca

24

<210> 22

25

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

30

<223> Beschreibung der künstlichen



1

2

3

4

100

5

6

## Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

5                   <400> 22  
                  gcgaccctcg acatggacgt tatct                   25

                  <210> 23  
                  <211> 25  
                  <212> DNA

10                  <213> Künstliche Sequenz

                  <220>  
                  <223> Beschreibung der künstlichen  
                                Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

15

                  <400> 23  
                  agataacgtc catgtcgagg gtcgc                   25

20                  <210> 24  
                  <211> 25  
                  <212> DNA  
                  <213> Künstliche Sequenz

25                  <220>  
                  <223> Beschreibung der künstlichen  
                                Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

30                  <400> 24  
                  tgttccgagg acgaatgagc atgag                   25



<210> 25

<211> 25

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

10 <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 25

ctcatgctca ttcgtcctcg gaaca

25

15

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

25

<400> 26

aggtagacga ccagatgatg tcagtg

26

<210> 27

30

<211> 26



<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

5     <223> Beschreibung der künstlichen  
          Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 27

cactgacatc atctggtcgt ctacct

26

10

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

15     <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
          Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

20

<400> 28

ggcggaatgt cgcatacagc ggtc

24

25

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

30

<220>





<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 29

5 cggagatgag atcattcatg ttggac

26

<210> 30

<211> 24

10 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

15 <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 30

ctctcctcat ctccaaaatt cggg

24

20

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

25

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

30

<400> 31



100

cagctaactc actcacttgg aggag

25

<210> 32

5

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

10

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 32

aagttctcta ctgcaataat gcgtg

25

15

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

20

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

25

<400> 33

ggttgaaaat acagacgaga cttt

24

30

<210> 34



<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 34

10 gggttgaaaat acagacgaga ctt

24

<210> 35

<211> 24

15 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
20 Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 35

aaagagcttc attgtcaata caga

24

25

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

30



1

2

3

4

5

- <220>
- <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden
- 5      <400> 36  
caattggcca gggaagcgaa gac 23
- 10      <210> 37  
         <211> 23  
         <212> DNA  
         <213> Künstliche Sequenz
- 15      <220>  
         <223> Beschreibung der künstlichen  
         Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden
- 20      <400> 37  
gtcttcgctt ccctggccaa ttg 23
- 25      <210> 38  
         <211> 24  
         <212> DNA  
         <213> Künstliche Sequenz
- 30      <220>  
         <223> Beschreibung der künstlichen  
         Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden



2

1

2

1

2

1



<400> 38  
cctggcttttg ctccctctc tgct 24

5 <210> 39  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 39

15 agcagagagg ggagcaaagc cagg 24

<210> 40  
<211> 23

20 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

25

<400> 40  
aacgcaatca atgtgtattt cgc 23

30



4

5

6

7

8

9

10

11

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

10

<400> 41

cccgacggca cataccat

18

<210> 42

15

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

20

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 42

gaaacgaaca acgcaacaca atct

24

25

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

30

<213> Künstliche Sequenz



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

- <220>
- <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden
- 5
- <400> 43
- caagctggac aatgtggaaa cc 22
- 10 <210> 44
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Künstliche Sequenz
- 15 <220>
- <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden
- <400> 44
- 20 yagagaaaacg aacaacgcaa ca 22
- <210> 45
- <211> 23
- 25 <212> DNA
- <213> Künstliche Sequenz
- <220>
- <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden
- 30



<400> 45

ttgatctcga gcccggaact atg

23

5

<210> 46

<211> 22

**<212> DNA**

### <213> Künstliche Sequenz

10

**<220>**

<223> Beschreibung der künstlichen

### Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

15

<400> 46

tctcgagccc ggaactatgg at

22

<210> 47

20

<211> 24

**<212> DNA**

### <213> Künstliche Sequenz

**<220>**

25

**<223> Beschreibung der künstlichen**

**Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden**

**<400> 47**

cccgaatttt ggagatgagg agag

24

30





<210> 48  
<211> 20  
<212> DNA  
5 <213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden  
10  
  
<400> 48  
ggncartgyg gnaaycarat 20  
  
15 <210> 49  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
20 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden  
  
<400> 49  
25 gaytgyytnc arggnttyca 20  
  
<210> 50  
<211> 20  
30 <212> DNA



<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

5           Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

<400> 50

tgraanccyt gnarrcartc

20

10

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

15

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen

Sequenz:Primer/Hybridisierungssonden

20

<400> 51

tcytgrtayt gytgrtaytc

20

25

